

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
MICHELE PATRÍCIA RODE

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS  
MULTIPOTENTES HUMANAS A HIDROGÉIS DE  
CARRAGENANA PARA REGENERAÇÃO CUTÂNEA EM  
MODELO MURINO DE EXCISÃO TOTAL**

FLORIANÓPOLIS/SC  
2015

MICHELE PATRICIA RODE

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS  
MULTIPOTENTES HUMANAS A HIDROGÉIS DE  
CARRAGENANA PARA REGENERAÇÃO CUTÂNEA EM  
MODELO MURINO DE EXCISÃO TOTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis/SC  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rode, Michele Patricia

Avaliação da associação de células estromais multipotentes humanas a hidrogéis de carragenana para regeneração cutânea em modelo murino de excisão total / Michele Patricia Rode ; orientador, Giordano Wosgrau Calloni ; coorientador, Rafael Diego da Rosa. - Florianópolis, SC, 2015.

110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Regeneração cutânea. 3. Célula estromal multipotente. 4. Hidrogel de carragenana. I. Wosgrau Calloni, Giordano . II. da Rosa, Rafael Diego . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais  
Silvio e Roseli, à minha irmã Silvia e  
ao meu namorado Flavio por todo  
apoio e amor.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Giordano Wosgrau Calloni, por todo ensinamento, incentivo e conselhos que foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu coorientador Rafael Diego da Rosa por ter aceitado fazer parte deste grupo, sendo essencial para a conclusão desse trabalho. Obrigada também pelos ensinamentos durante o estágio de docência que foram fundamentais para a minha formação.

Aos professores do LACERT, Andrea Gonçalves Trentin pela colaboração e incentivo. E Ricardo Castilho Garcez pelos conselhos e supervisão no estágio de docência.

À professora Leila Hayashi, por ter disponibilizado a carragenana, fundamental para a realização deste trabalho.

Ao professor Jair Adriano Kopke de Aguiar da Universidade Federal de Juiz de Fora, por colaborar com o projeto realizando a caracterização química da carragenana.

Aos colegas/amigos de laboratório que sempre me apoiaram, incentivaram e tornaram os meus dias mais leves. Vocês foram muito importantes para a construção e conclusão deste trabalho. Obrigada por toda ajuda!

Aos alunos de iniciação científica, Felipe e Maiara por terem me ajudado a construir este trabalho. Obrigada por toda ajuda com os experimentos e pela confiança.

Aos demais professores da pós-graduação e outros profissionais da UFSC que contribuíram para a minha formação e crescimento acadêmico.

Agradeço aos meus pais Silvio e Roseli que sempre acreditaram no meu potencial e me apoiaram incondicionalmente. Agradeço pela dedicação, amor, educação e por estarem sempre ao meu lado. Muito obrigada!

À minha irmã Silvia por todo amor e companheirismo.

Ao meu amor Flavio pela paciência, amor e constante apoio, incentivo e inspiração. Fico muito feliz por você fazer parte da minha vida. Te amo muito!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar não  
seremos capazes de resolver os problemas causados pela  
forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*

## RESUMO

Neste estudo, foi avaliado o potencial de um novo tratamento para lesões cutâneas baseado em dois componentes da engenharia de tecidos: células e arcabouço. Foi utilizado como arcabouço o hidrogel de carragenana, um polímero termo reversível de origem natural, associado a células estromais multipotentes (CEM) humanas no tratamento de lesões cutâneas em modelo murino. Inicialmente foi realizada a caracterização química da carragenana teste, obtida da alga *Kappaphycus alvarezii* cultivada em Florianópolis e da carragenana comercial (Sigma®). Os resultados mostraram que a carragenana teste é da classe *kappa* e apresenta porcentagem de sulfato semelhante à encontrada na carragenana comercial (Sigma®). Em seguida, foi avaliada a regeneração cutânea após 3, 7 e 14 dias de pós-operatório. Os resultados mostraram que o tratamento com CEM encapsuladas no hidrogel de carragenana teste (HCT) não altera a densidade do infiltrado leucocitário, a vascularização e a espessura da epiderme, além de aumentar o tecido de granulação e o depósito de colágeno quando comparado ao grupo sem tratamento (S/T). Além disso, o tratamento com CEM + HCT apresenta um menor infiltrado leucocitário, não altera a espessura do tecido de granulação e a vascularização, aumenta o depósito de colágeno quando comparado aos grupos HCT e CEM. Os resultados mostraram também que as células humanas permanecem no tecido cicatricial murino após 3 dias de pós-operatório. Em conclusão, este estudo mostrou que a carragenana obtida da alga *K. alvarezii* cultivada em Florianópolis representa um material de baixo custo com potencial para aplicações terapêuticas. Apesar da associação do hidrogel de carragenana teste com as CEM humanas não apresentar melhora quando comparado ao grupo sem tratamento, demonstrou bons resultados quando comparado aos tratamentos isoladamente (grupos HCT e CEM) e representa uma abordagem nova, barata e potencialmente aplicável na engenharia de tecidos.

**Palavras-chave:** regeneração, pele, arcabouço, hidrogel de carragenana, células estromais multipotentes.



## ABSTRACT

This study evaluated the potential of a new treatment for cutaneous wound based on two components of tissue engineering: cells and scaffold. Carrageenan hydrogel, a thermo reversible polymer of natural origin was used as a scaffold for the delivery of human multipotent stromal cells (MSC) for treatment of cutaneous wound in mice. At first the chemical characterization of native carrageenan obtained from seaweed *Kappaphycus alvarezii* grown in Florianopolis and commercial carrageenan (Sigma®) was carried out. The results showed that the native carrageenan belongs to the kappa class and shows a percentage of sulphate similar to that found in commercial sample. Evaluation of mouse skin wound healing was carried out by three steps: excisional wound in the dorsal region, treatment application and coating with Tegaderm® dressing. The results after 3, 7 and 14 days post-wounding showed that treatment with MSC encapsulated in native carrageenan hydrogel (NCH) does not change the density of the leukocyte infiltrate, vascularity and the thickness of the epidermis, and increase granulation tissue and collagen deposition when compared to the control untreated group. Furthermore, treatment with MSC encapsulated in NCH has a lower leukocyte infiltration, does not change the thickness of the granulation tissue, epidermis and vascularity, and increase collagen deposition when compared with MSC and NCH groups. In addition, human cells were detected in the scar tissue within 72 h post-wounding. In conclusion, this study showed that the carrageenan obtained of seaweed *K. alvarezii* cultivated in Florianopolis is a low cost material with potential therapeutic applications. The carrageenan hydrogel association with human MSC did not showed improvement compared to untreated group, but showed good results when compared to NCH and MSC groups. Thus, MSC encapsulated NCH represents a new approach applicable in tissue engineering.

**Key words:** skin, regeneration, scaffold, carrageenan hydrogel, multipotent stromal cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática da estrutura da epiderme humana....	17
Figura 2 – Ilustração esquemática dos componentes da derme humana. .....	18
Figura 3 - Primeira etapa do reparo tecidual: inflamatória. ....	19
Figura 4 - Segunda etapa do reparo tecidual: proliferativa. ....	20
Figura 5 - Terceira etapa do reparo tecidual: remodelamento.....	22
Figura 6 – Localização das células tronco na pele humana. ....	26
Figura 7 - Ação parácrina das CEM no processo de reparo. ....	28
Figura 8 - Estrutura química dos principais tipos de carragenana. ....	31
Figura 9 - Modelo não contrátil de lesão cutânea. ....	41
Figura 10 - Esquema das análises macro e microscópicas.....	42
Figura 11 - Estruturas da pele e identificação do tecido de granulação na lesão cutânea em lâmina histológica. ....	45
Figura 12 - Espectro FT-Raman da carragenana comercial e da carragenana teste na região de 600 a 1500 cm <sup>-1</sup> .....	49
Figura 13 - Eletroforese de carboidratos assistida por fluoróforo (FACE) dos sacarídeos hidrolisados da carragenana comercial (CC) e da carragenana teste (CT). ....	50
Figura 14 – Caracterização e encapsulamento das CEM humanas. ....	51
Figura 15 – Redução no tamanho da lesão (diâmetro médio) nos 3 períodos de pós-operatório.....	54
Figura 16 - Densidade de leucócitos infiltrantes nas lesões cutâneas no 3º dia de pós-operatório. ....	56
Figura 17 – Tecido de granulação, nos dias 7 e 14 de pós-operatório. .	57
Figura 18 - Espessura do tecido de granulação nos dias 7 e 14 de pós- operatório. ....	58
Figura 19 – Neovascularização das lesões no 7º e 14º dia de pós- operatório. ....	60
Figura 20 - Densidade de vasos sanguíneos nas lesões cutâneas no 7º e 14º dia de pós-operatório. ....	61
Figura 21 – Depósito de colágeno (cor azul) na derme íntegra e nos grupos experimentais no 7º e 14º dia de pós-operatório.....	63
Figura 22 - Intensidade relativa da cor azul referente ao depósito de colágeno nas lesões cutâneas, nos dias 7 e 14 de pós-operatório.....	64
Figura 23 – Depósito de colágeno do tipo I nas lesões cutâneas no 14º dia de pós-operatório.....	65
Figura 24 – Epiderme do tecido cicatricial no 14º dia de pós-operatório. .....	67

Figura 25 - Espessura da epiderme e porcentagem de reepitelização no 14º dia de pós-operatório. ....	68
Figura 26 – Células humanas marcadas com anticorpo antinúcleo humano.....	71
Figura 27 – Imunomarcção de lâmina de mucosa bucal humana utilizando o anticorpo antinúcleo humano. ....	97
Figura 28 – CEM transfectadas com plasmídeo pCX-GFP.....	102
Figura 29 – CEM após eletroporação na condição A3.....	103

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Porcentagem de sulfato das amostras de carragenana.....	50
Tabela 2 - Condições testadas na eletroporação para transfecção das CEM humanas com o plasmídeo pCX-EGFP.....	101

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

3D – Tridimensional  
AMAC – 2-aminoacridona  
BCIP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato  
CC – Carragenana comercial  
CEM – Célula estromal multipotente  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
CT – Carragenana teste  
CTM – Célula tronco mesenquimal  
DAB - diaminobenzidina-3,3'  
DAPI - 4'-6-diamino-2-fenilindol  
DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco  
EGF – Fator de crescimento epidermal  
FACE – Eletroforese de Carboidratos Assistida por Fluoróforo  
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto  
GFP – proteína verde fluorescente  
HCC – Hidrogel de carragenana comercial  
HCT – Hidrogel de carragenana teste  
HE – Hematoxilina e eosina  
HGF – Fator de crescimento de hepatócitos  
IL – Interleucina  
LACERT – Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual  
LAMAR – Laboratório de Algas Marinhas  
LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia  
LIAA - Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura  
MAB - Tampão de ácido maleico  
MABT - Tampão de ácido maleico acrescido de Tween  
NBT - nitroazul de tetrazólio  
PBS - Tampão fosfato salino  
PEG – Polietilenoglicol  
PVA – Acetato de polivinila  
SBF - Soro bovino fetal  
TA – Temperatura ambiente  
TFA - Trifluoroacético  
TGF – Fator de crescimento transformante  
TNF – Fator de necrose tumoral  
UV - Ultravioleta  
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1. A PELE HUMANA.....	16
1.2. O PROCESSO DE REPARO DA PELE.....	18
1.3. TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS .....	22
1.4. ENGENHARIA DE TECIDOS .....	24
1.4.1. Moléculas bioativas.....	24
1.4.2. Células.....	25
1.4.3. Arcabouço .....	29
2. OBJETIVOS .....	34
2.1. OBJETIVO GERAL.....	34
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	35
3.2. EXTRAÇÃO DA CARRAGENANA DA ALGA <i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	35
3.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CARRAGENANA TESTE.....	36
3.3.1. Espectroscopia FT-Raman .....	36
3.3.2. Eletroforese de Carboidratos Assistida por Fluoróforo (FACE).....	37
3.3.3. Dosagem de Sulfato Inorgânico .....	37
3.4. ASSOCIAÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MULTIPOTENTES (CEM) AO HIDROGEL DE CARRAGENANA TESTE (HCT) .....	38
3.4.1. Isolamento da cultura primária a partir dos fragmentos de biopsia da derme.....	38
3.4.2. Caracterização da população das CEM.....	39
3.4.2.1. Imunofenotipagem por meio de citometria de fluxo.....	39
3.4.2.2. Diferenciação das CEM em fenótipos mesodermis.....	39
3.4.3. Preparo do hidrogel de carragenana.....	39
3.4.4. Encapsulamento das CEM no HCT .....	40
3.5. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REPARO TECIDUAL DA ASSOCIAÇÃO DAS CEM AO HCT.....	40
3.5.1. Animais.....	40
3.5.2. Procedimento cirúrgico .....	41
3.5.3. Estudo do processo de reparo.....	42
3.5.4. Estudo macroscópico da lesão .....	42
3.5.5. Processamento das amostras para estudo histológico .....	43
3.5.5.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina .....	43
3.5.5.2. Coloração de Mallory.....	43
3.5.5.3. Imuno-histoquímica .....	44
3.5.6. Avaliação do infiltrado inflamatório .....	44

3.5.7. Determinação da espessura do tecido de granulação.....	44
3.5.8. Avaliação da angiogênese .....	45
3.5.9. Avaliação do depósito de colágeno .....	45
3.5.10. Avaliação da reepitelização.....	46
3.6. DETECÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MULTIPOTENTES (CEM) HUMANAS NO TECIDO CICATRICIAL MURINO .....	46
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>4. RESULTADOS</b> .....	48
4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CARRAGENANA TESTE.....	48
4.2. ASSOCIAÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MULTIPOTENTES (CEM) AO HIDROGEL DE CARRAGENANA TESTE (HCT).....	50
4.4. POTENCIAL DE REPARO CUTÂNEO .....	52
4.4.1. Análise macroscópica.....	52
4.4.2. Infiltrado inflamatório .....	55
4.4.3. Tecido de granulação .....	56
4.4.4. Reepitelização .....	66
4.5. RESUMO DOS RESULTADOS.....	69
4.6. DETECÇÃO DAS CEM HUMANAS NO TECIDO CICATRICIAL.....	70
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	92
ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP .....	94
ANEXO C – Parecer CEUA.....	95
APÊNDICE A – Imunomarcção de núcleo humano.....	96
APÊNDICE – B – Hibridização in situ .....	98
APÊNDICE C – Transfecção com GFP.....	100

## 1. INTRODUÇÃO

O tratamento de lesões cutâneas é uma etapa crucial na qualidade do reparo tecidual, podendo trazer melhoras significativas na qualidade de vida e na longevidade dos pacientes (MACNEIL, 2007). No caso de pacientes com lesões que atingem a derme profunda ou a hipoderme, o tecido adjacente não é capaz de recuperar a lesão. Nesses casos, ainda existem diversos problemas clínicos que enfatizam a necessidade de maiores estudos para o desenvolvimento de novos tratamentos. O primeiro problema inclui o grande risco de morte e a pouca pele saudável que ainda pode ser utilizada em enxertos em pacientes que sofreram queimaduras profundas e/ou extensas. O segundo inclui as infecções secundárias e o fornecimento inadequado de sangue em pacientes com úlceras crônicas (BOTTCHER-HABERZETH; BIEDERMANN; REICHMANN, 2010).

Devido à enorme complexidade do processo de reparo, os tratamentos disponíveis ainda não são capazes de recuperar o tecido de forma completa. Além disso, o alto custo dos tratamentos atuais inviabiliza o uso pelo sistema público de forma abrangente. Sendo assim, a busca por um tratamento eficiente e de baixo custo é um dos principais objetivos na medicina regenerativa.

### 1.1. A PELE HUMANA

A pele é o maior órgão do corpo e desempenha um papel vital na defesa contra choques mecânicos, na proteção contra a radiação ultravioleta, no metabolismo do cálcio e contra a entrada de agentes patogênicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A pele também impede a perda substancial dos fluidos corpóreos, promovendo dessa forma um papel importante na hidratação e termorregulação do organismo. Além das funções sensoriais e de proteção, a pele também constitui um importante elemento estético (BONFIELD et al., 2010).

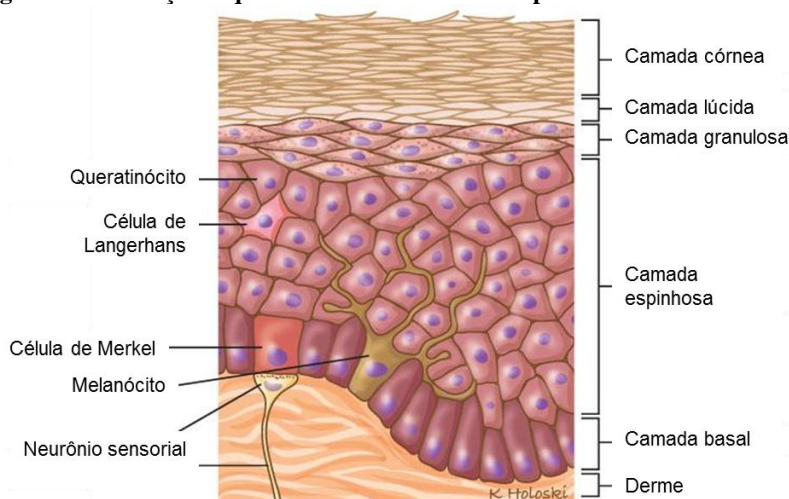
Estruturalmente, a pele pode ser dividida em duas regiões principais: a epiderme e a derme. A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado apresentando geralmente 75 a 150 µm de espessura (NIEMANN; WATT, 2002). Na sua maior complexidade (calcanhar, cotovelo e joelho), a epiderme apresenta 5 camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) (Figura 1). Entretanto, na maior parte do corpo, onde a pele é fina, a epiderme é mais simples, frequentemente sem as camadas granulosa e lúcida. Na camada basal da



epiderme está localizado um dos nichos de células tronco da pele. Esse nicho apresenta alta atividade mitótica e junto com a camada espinhosa é responsável pela renovação da epiderme. A camada granulosa tem apenas 3 a 5 camadas de células que são caracterizadas pela presença de grânulos lamelares constituídos por glicolípídeos responsáveis pela impermeabilização da pele e grânulos de querato-hialina que são responsáveis pela liberação de queratina. Por fim, as camadas lúcida e córnea apresentam células achatadas com grande quantidade da proteína queratina, um elemento do citoesqueleto pertencente à classe dos filamentos intermediários e que fornece muita resistência ao tecido epidermal.

A epiderme possui quatro tipos celulares principais: os queratinócitos (células mais abundantes), os melanócitos (derivados da crista neural), as células de Langerhans (células dendríticas) e as células de Merkel (receptores sensoriais) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) (Figura 1).

**Figura 1 - Ilustração esquemática da estrutura da epiderme humana.**

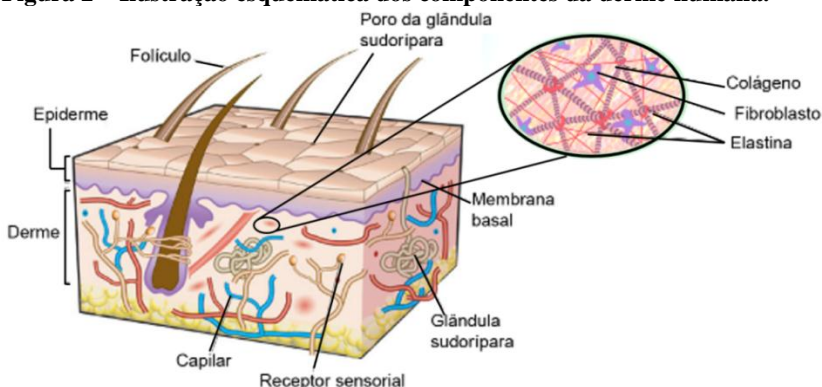


As células tronco da epiderme diferenciam-se a partir da camada basal dando origem aos queratinócitos. Conforme essas células vão subindo nas camadas, perdem seus núcleos. As camadas superiores da epiderme apresentam grande quantidade de queratina, fornecendo uma barreira para a perda de água e para a entrada de agentes invasores (Imagem adaptada de HOLOSKI, 2015).

A derme, situada logo abaixo da epiderme, constitui o cerne da pele e é composta principalmente por fibroblastos e um rico sistema

vascular (Figura 2). O microambiente extracelular da derme é constituído por uma rede altamente hidratada de macromoléculas insolúveis, como colágeno e elastina (BONFIELD et al., 2010). Além disso, a derme possui uma diversidade de glicoproteínas (ex. laminina e fibronectina), proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Nesse microambiente também são encontradas moléculas sinalizadoras solúveis, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (GURTNER et al., 2008). Na derme também estão localizados os anexos epidérmicos, como os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas.

**Figura 2 – Ilustração esquemática dos componentes da derme humana.**



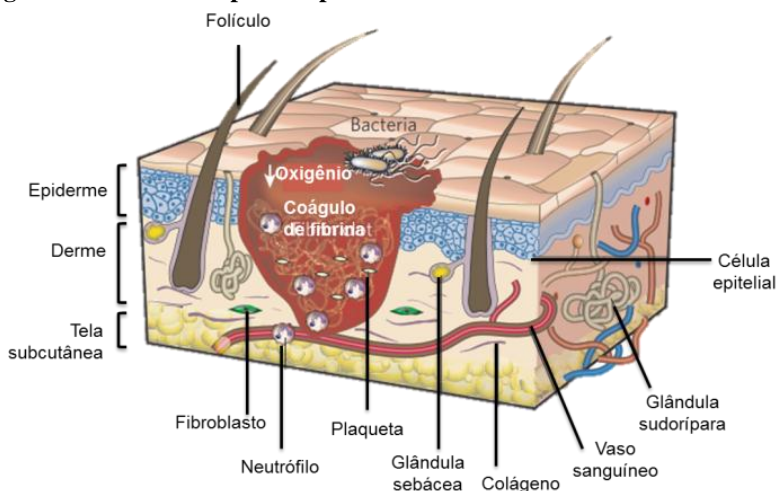
A epiderme está firmemente aderida à derme por meio da membrana basal. A derme varia de espessura dependendo do local do corpo e é composta principalmente por colágeno I e apresenta os seguintes anexos dérmicos: folículos pilosos e glândulas sudoríparas que são revestidos por queratinócitos epidérmicos. A derme é bem vascularizada e apresenta receptores para o toque, dor e temperatura (Imagem adaptada de MACNEIL, 2007).

## 1.2. O PROCESSO DE REPARO DA PELE

O processo de reparo de lesões é altamente dinâmico envolvendo complexas interações entre moléculas da matriz extracelular, mediadores solúveis, além da infiltração de leucócitos e outros tipos celulares. A finalidade desse processo é recuperar a homeostase e a integridade do tecido por meio de três etapas consecutivas que se sobrepõem no tempo e no espaço: inflamatória, proliferativa e remodelamento (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

A fase inflamatória tem início imediatamente após a lesão tecidual e dura em torno de 3 dias em lesões com inflamação aguda. Nessa fase, os componentes das cascatas de coagulação, sinalização inflamatória e do sistema imune são necessários para remoção do tecido morto e para prevenir a perda de sangue e linfa, e a entrada de agentes infecciosos (Figura 3) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

**Figura 3 - Primeira etapa do reparo tecidual: inflamatória.**



Esta fase dura cerca de 3 dias após a lesão. A ferida é caracterizada por um ambiente com baixa oxigenação, no qual há formação de um coágulo de fibrina. Os neutrófilos e plaquetas são abundantes na ferida (Imagem adaptada de GURTNER et al., 2008).

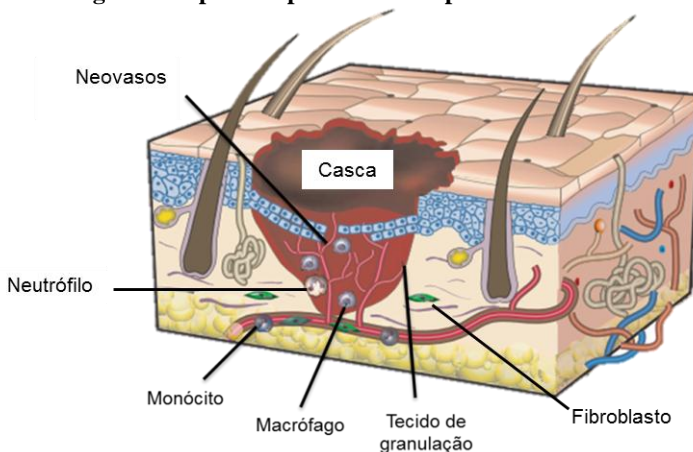
A homeostase é atingida pela formação de um tampão de plaquetas e por uma matriz de fibrina, sendo que esta última serve de arcabouço para invasão e estabelecimento dos neutrófilos recrutados pela interleucina 1-beta ( $IL-1\beta$ ), pelo fator de necrose tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ ) e pelo interferon gama ( $IFN-\gamma$ ) (GURTNER et al., 2008). Ao final do 1º dia, os neutrófilos constituem 50% das células presentes na lesão e sua função principal é eliminar os microrganismos invasores por fagocitose.

Após 2-3 dias, ocorre a migração dos monócitos e diferenciação para macrófagos. Nessa etapa da fase inflamatória, os macrófagos secretam citocinas que estimulam a migração de fibroblastos e células epiteliais, sendo de grande importância para a continuidade do processo

de reparo. Os leucócitos são os principais componentes da resposta inflamatória, sendo que o aumento ou diminuição na infiltração dessas células no tecido danificado pode afetar a migração, proliferação e diferenciação de outros tipos celulares. Dessa forma, os leucócitos influenciam direta e indiretamente na qualidade do reparo tecidual (GURTNER et al., 2008).

A liberação dos mediadores químicos pelos macrófagos dá início à migração e ativação de fibroblastos finalizando a fase inflamatória e iniciando a fase proliferativa. Essa fase pode durar de 2 a 10 dias e é caracterizada pela migração e diferenciação de vários tipos celulares, sendo os fibroblastos os mais abundantes. Além disso, novos vasos sanguíneos são formados, fibroblastos e macrófagos substituem a matriz de fibrina pelo tecido de granulação. Essa denominação do novo tecido é devido à superfície da lesão conter grânulos vermelhos, sendo que essa aparência é referente à organização dos vasos neoformados que se encontram perpendiculares em relação à superfície. Ainda nesse estágio, ocorre o fechamento da epiderme pela migração, proliferação e diferenciação dos queratinócitos sobre a derme lesionada, sendo que essa migração é favorecida quando a superfície da ferida está úmida e oxigenada (GURTNER et al., 2008) (Figura 4).

**Figura 4 - Segunda etapa do reparo tecidual: proliferativa.**



Esta fase pode durar cerca de 2-10 dias após a lesão. Ela é caracterizada pela proliferação de fibroblastos, migração de macrófagos e formação de novos vasos sanguíneos que preenchem a lesão. As células epiteliais (marcadas na cor azul) migram sob a casca de fibrina (Imagem adaptada de GURTNER et al., 2008).

Nessa fase ainda, os fibroblastos invadem a matriz de fibrina por meio da produção de metaloproteinases e secretam no local da lesão alguns fatores de crescimento que regulam positivamente a reepitelização, os quais incluem membros da família do fator de crescimento de fibroblasto (FGF), o fator de crescimento epidermal (EGF) e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (WERNER; GROSE, 2003). Em contrapartida, o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) regula negativamente a reepitelização (VERRECCHIA; MAUVIEL, 2002).

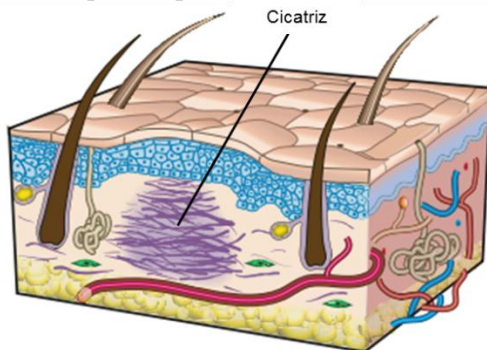
Além disso, os fibroblastos depositam ainda uma grande quantidade de fibronectina, uma importante molécula da matriz extracelular que auxilia na fixação das próprias células, além do ácido hialurônico, um polissacarídeo não sulfatado que auxilia na resistência do tecido (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Entretanto, essas moléculas predominam no tecido de granulação somente no início do processo, sendo substituídas em seguida por proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Essa substituição favorece a diferenciação das células presentes no tecido, induzindo a maturação dos fibroblastos que passam de um fenótipo migratório e replicativo para um fenótipo com alta síntese proteica e secreção de colágeno III (GURTNER et al., 2008). Em etapas mais tardias da fase proliferativa, os fibroblastos são atraídos por macrófagos para as bordas da ferida e alguns se diferenciam em miofibroblastos (OPALENIK; DAVIDSON, 2005). Os miofibroblastos são células contráteis que, ao longo do tempo, promovem a fusão das bordas das feridas. Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem uma matriz extracelular rica em colágeno e que forma o cerne da cicatriz (BIELEFELD; AMINI-NIK; ALMAN, 2013). Ao final da fase proliferativa, a lesão está totalmente fechada pelo tecido de granulação, sendo a partir de então enriquecido por fibras colágenas que são remodeladas continuamente dando origem à cicatriz (GURTNER et al., 2008).

O remodelamento da matriz extracelular é o terceiro e último estágio do reparo. Ele começa de duas a três semanas após a lesão e dura cerca de um ano ou mais. Durante esse estágio, todos os processos ativados após a lesão diminuem e cessam. A maior parte das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos entram em apoptose deixando uma matriz que consiste em colágeno e outras moléculas da matriz extracelular que formam a cicatriz. Essas alterações resultam na contração da ferida e formação de uma cicatriz acelular. Por fim, a

matriz acelular é ativamente remodelada (substituição do colágeno do tipo III por tipo I) por metaloproteinases secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (BONFIELD et al., 2010).

Embora o novo tecido forneça a restauração da barreira da pele, ele não apresenta as mesmas características funcionais do tecido íntegro e ocorre a formação de uma cicatriz (Figura 5) (LEVENSON; JANUARY, 1965). Os anexos não são recuperados totalmente e a cicatriz apresenta coloração pálida, pois o número de melanócitos também é deficiente. Além disso, as cicatrizes apresentam baixa vascularização (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

**Figura 5 - Terceira etapa do reparo tecidual: remodelamento.**



Esta etapa dura um ano ou mais. Os fibroblastos que migraram para a ferida produzem uma matriz desorganizada de colágeno (em roxo) que forma a cicatriz. Além disso, ocorre a contração da ferida próximo à superfície. A espessura da epiderme é ligeiramente maior do que o tecido íntegro e a região da cicatriz não contém anexos (Imagem adaptada de GURTNER et al., 2008).

### 1.3. TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS

Os primeiros avanços importantes no tratamento de lesões cutâneas surgiram quando Rheinwald e Green, em 1975, cultivaram queratinócitos sobre uma camada de fibroblastos murinos (3T3) irradiados (RHEINWALD; GREEN, 1975). Esse estudo permitiu a expansão do número de queratinócitos, *in vitro*, em até 500 vezes em poucas semanas. A expansão das células só foi alcançada na presença dos fibroblastos, indicando uma complexa interação entre os queratinócitos e os fibroblastos, visto que anteriormente era difícil expandir culturas de células epidermais. A técnica desenvolvida por Rheinwald e Green permitiu a aplicação clínica de células epidermais

(RHEINWALD; GREEN, 1977). Essa técnica foi de grande importância, pois em lesões profundas ou extensas, onde não há tecido doador para o enxerto, a regeneração da epiderme e seus anexos são dificultados. No entanto, após as primeiras aplicações clínicas, diversas desvantagens foram observadas devido à ampla variabilidade ocasionada pela idade do paciente, local e estado da lesão (ATIYEH; COSTAGLIOLA, 2007). Além disso, os enxertos de células tronco epidermais não foram capazes de restaurar totalmente a função da pele. Os anexos cutâneos como folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas não foram regenerados, o que sugere que as interações entre células epiteliais e mesenquimais são essenciais para formar os anexos.

Outro progresso importante foi o desenvolvimento de uma pele artificial de duas camadas, sendo constituída por uma camada de colágeno tipo I bovino e glicosaminoglicanos de tubarão, coberta por uma membrana de silicone (BURKE et al., 1981). Atualmente, esse substituto está comercialmente disponível como *Integra Artificial Skin*<sup>®</sup>. O Integra<sup>®</sup> foi lançado comercialmente nos Estados Unidos em 1996 e no Brasil começou a ser utilizado em 2002 no Hospital Infantil Joana de Gusmão em Florianópolis, um centro de referência nacional no tratamento de queimaduras, apresentando excelentes resultados (MAES et al., 2012).

Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza o tratamento com matrizes de regeneração, sendo o Integra<sup>®</sup> uma das matrizes mais utilizadas. Entretanto, o SUS trata somente pacientes com queimaduras muito profundas ou de grandes extensões e as cicatrizes queloides ou hipertróficas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. BRASÍLIA., 2011). Conforme descrito na Portaria Nº 1.009 de 30 de dezembro de 2011, o SUS concede matrizes que custam no máximo o valor de R\$ 49,56/cm<sup>2</sup>, sendo que as características da matriz são de escolha da equipe médica e a quantidade máxima por paciente é de 250 cm<sup>2</sup>. No entanto, somente os hospitais de Alta Complexidade são habilitados para fazer esse tratamento. No estado de Santa Catarina, o atendimento específico para queimaduras pode ser encontrado no Hospital Infantil Joana de Gusmão (Florianópolis), no Hospital Municipal São José (Joinville) e no Hospital e Maternidade Tereza Ramos (Lages).

Ainda que os resultados obtidos na clínica sejam satisfatórios, o Integra<sup>®</sup> apresenta algumas desvantagens, pois requer duas etapas cirúrgicas: a primeira para aplicação da matriz e a segunda para retirada da camada de silicone e aplicação de um enxerto autólogo de epiderme.

Outro fator negativo é o alto custo do Integra<sup>®</sup>, em torno de R\$ 20 mil por unidade (SANTA CATARINA.DIÁRIO OFICIAL, 2012).

Todos esses fatores geram um grande custo para a sociedade e enfatizam a necessidade de um atendimento mais efetivo. Apesar de o Integra<sup>®</sup> ser um substituto importante, faz-se necessário novos estudos sobre o reparo cutâneo e novos tratamentos, não só devido ao aumento nos custos de hospitalizações, mas também para aperfeiçoar os resultados funcionais e estéticos.

#### 1.4. ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos constitui um campo de conhecimento interdisciplinar e busca desenvolver substitutos para o tratamento de tecidos ou órgãos que passaram por alguma agressão, doença e/ou processo degenerativo (CHEN et al., 2009; PLACE; EVANS; STEVENS, 2009). No caso da pele, o objetivo final da engenharia de tecidos é produzir substitutos para esse órgão que possam recriar as propriedades da matriz extracelular encontrada no organismo e que permitam que os complexos eventos do reparo ocorram. Além disso, para minimizar os efeitos decorrentes das lesões cutâneas, os substitutos devem permitir a migração das células do tecido e induzir a proliferação e diferenciação de forma organizada com o mínimo de retração. Para isso, três elementos podem ser utilizados: moléculas bioativas, células e um arcabouço (MACRI; CLARK, 2009).

##### 1.4.1. Moléculas bioativas

Durante os processos iniciais de reparo, as células inflamatórias e plaquetas secretam fatores e citocinas que regulam diretamente os processos de angiogênese e reepitelização (WERNER; GROSE, 2003). Essas moléculas são capazes de atuar em locais distantes ou por longos períodos, pois podem ser sequestradas por proteínas e glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular e assim atuar em processos mais tardios do reparo (WERNER; GROSE, 2003).

A utilização dessas moléculas na engenharia de tecidos busca melhorar o processo de reparo, por meio do controle do sistema, uma vez que a compreensão do papel dessas moléculas vem sendo estudado no desenvolvimento embrionário (KAMEL et al., 2013). Dentre as moléculas que desempenham funções importantes durante o processo de reparo, pode-se citar o TGF- $\beta$  e os FGFs.



Devido a sua importância, diversas estratégias têm sido empregadas para a entrega de moléculas bioativas, sendo mais comum a aplicação intravenosa ou diretamente na lesão. Entretanto, essas metodologias não têm sido bem sucedidas devido à curta meia-vida da maioria das moléculas bioativas (LAZAROUS et al., 1996).

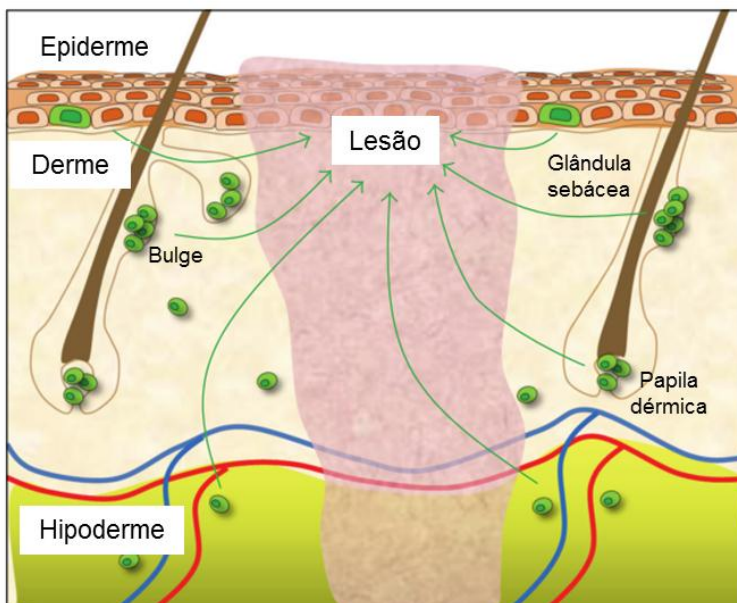
#### 1.4.2. Células

As células utilizadas no tratamento de lesões podem ser autólogas (do mesmo paciente), alogênicas (de um doador compatível) ou xenogênicas (doador de espécie diferente). Além disso, podem ser células tronco ou combinações de diferentes tipos de células diferenciadas como queratinócitos e fibroblastos (GRIFFITH; NAUGHTON, 2002). Nesse contexto, as células tronco adultas constituem uma fonte atrativa, pois são definidas pela capacidade de se autorrenovar e originar diversos tipos celulares diferenciados (NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011).

Atualmente, acredita-se que todos os tecidos adultos apresentam nichos de células tronco responsáveis pelo reparo de lesões (LI; XIE, 2005). Sendo assim, a pele vem sendo estudada por constituir uma potencial fonte de células tronco, pois proporciona a obtenção de grandes quantidades de tecido de forma pouco invasiva (CRIGLER et al., 2007). Além disso, os fragmentos de pele descartados após cirurgias estéticas tornam a obtenção dessas células um método menos suscetível às restrições de ordem ética.

As células tronco da pele apresentam alta taxa de proliferação celular e capacidade de regenerar o tecido a cada duas semanas, podendo ser encontradas em vários nichos, incluindo a epiderme e a derme (Figura 6).

**Figura 6 – Localização das células tronco na pele humana.**



Populações de células tronco identificadas em vários nichos na pele contribuem para o processo de reparo cutâneo. As células tronco epidermais estão localizadas em uma região denominada bulge dos folículos pilosos, nas glândulas sebáceas e na camada basal da epiderme. As células tronco da derme estão localizadas na papila dérmica ou associadas à matriz extracelular e aos vasos sanguíneos do tecido conjuntivo (Imagem adaptada de WONG et al., 2012).

Após o isolamento, o nicho de origem das células obtidas da derme não é claro, pois todas essas células apresentam características semelhantes às células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (WONG et al., 2012). O termo “célula tronco mesenquimal” foi descrito pela primeira vez em 1991, por Arnold Caplan, baseado em experimentos clássicos realizados por Friedenstein e colaboradores (1968), no qual foi relatado que células estromais da medula óssea podiam gerar osteoblastos após o transplante para regiões heterotópicas (ou seja, regiões diferentes da original, no caso, outras regiões que não o tecido ósseo) (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008; AFANASYEV et al., 2009).

Desde então, diversos nomes têm sido propostos de modo a refletir as mudanças no conhecimento a respeito das características das

CTMs, visto que atualmente podem ser encontradas em diversos tecidos adultos, como no músculo esquelético, tecido adiposo, cordão umbilical e polpa dental. Neste trabalho, o termo “CÉLULA ESTROMAL MULTIPOTENTE” (CEM) será utilizado para descrever as células que apresentam rápida adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, expansão *in vitro*, expressão ou ausência de antígenos de superfície específicos (CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup> e CD34<sup>-</sup>) e potencial para diferenciação em osteoblasto, adipócito e condrócito (DOMINICI et al., 2006).

Diversos estudos que utilizaram as CEM no tratamento de lesões teciduais descrevem uma restauração estrutural e funcional do tecido. Inicialmente, esse efeito das CEM no processo de reparo era baseado na diferenciação dessas células (LI; FU, 2012). Embora estudos anteriores mostrem que as CEM da medula óssea são capazes de se diferenciar *in vivo* em tipos celulares específicos da pele, como queratinócitos e células endoteliais (FU et al., 2006; SASAKI et al., 2008), uma nova possibilidade baseada na ação parácrina das CEM tem sido investigada.

Os dados atuais sugerem que a diferenciação das CEM é limitada devido à baixa sobrevivência no local da lesão após o transplante, tornando-se evidente que as melhorias funcionais atribuídas à diferenciação ocorrem principalmente pela secreção e liberação no tecido hospedeiro de moléculas bioativas pelas CEM (ou seja, um efeito parácrino). Sendo assim, a sinalização parácrina é provavelmente o principal mecanismo pelo qual as CEM influenciam as células predominantes na lesão cutânea (GNECCHI M, ZHANG Z, 2008; WU; ZHAO; TREDGET, 2010; MAXSON et al., 2012). Essa mudança de papel das CEM durante o processo de reparo aumenta significativamente a gama de aplicações terapêuticas, uma vez que não é necessária a presença das células por longos períodos.

Na sinalização parácrina, as células liberam moléculas que afetam a proliferação, migração e expressão gênica de células-alvo que estão a uma distância relativamente curta (ação local). Diversos tipos de células da pele, incluindo células epiteliais e endoteliais, queratinócitos e fibroblastos são responsivos aos fatores secretados pelas CEM (CHEN et al., 2008); MEIRELLES et al., 2009). Nesse sentido, diversos estudos buscam elucidar os mecanismos parácrinos das CEM.

As moléculas parácrinas secretadas pelas CEM pode influenciar as três fases do processo de reparo, principalmente atenuando a resposta inflamatória (WONG et al., 2011) (Figura 7). Estudos têm mostrado que as CEM em um ambiente inflamatório são capazes de diminuir a

produção de citocinas pró-inflamatórias como  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$ , ao mesmo tempo que aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 e -4 e inibem a proliferação de linfócitos T (DI NICOLA et al., 2002; KRAMPERA et al., 2003; AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

**Figura 7 - Ação parácrina das CEM no processo de reparo.**



As CEM podem atuar durante as 3 fases do reparo por meio da sinalização parácrina. A regulação da inflamação ocorre principalmente pela supressão de  $\text{TNF-}\alpha$  e secreção de  $\text{IL-10}$  e  $\text{IL-4}$ . Na fase proliferativa, as CEM secretam diversos fatores que recrutam diferentes tipos celulares. Na fase final do processo de reparo, as CEM regulam a reepitelização e o depósito de colágeno pela secreção de  $\text{TGF}$  e  $\text{KGF}$  (Imagem adaptada de MAXSON et al., 2012).

Durante a fase proliferativa, que é caracterizada pela angiogênese, formação do tecido de granulação, reepitelização e contração da lesão, as CEM podem regular a sobrevivência, proliferação, migração e expressão gênica de células epiteliais, endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (CHEN et al., 2008; ESTRADA et al., 2009; HOCKING; GIBRAN; BOX, 2010; YANG et al., 2011). Os efeitos pró-angiogênicos das CEM têm sido observados em modelos de isquemia e ocorrem devido à secreção do FGF e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (KINNAIRD et al., 2004; HUNG et al., 2007). Da mesma forma, a secreção de FGF e de HGF pelas CEM previne a fibrose, embora os mecanismos moleculares ainda não estejam elucidados (LI et al., 2009; SUGA et al., 2009). Além disso, estudos mostram que as CEM são capazes de estimular a migração de fibroblastos e aumentar os níveis de colágeno I, III e fibronectina, além de diminuir os níveis transcricionais de metaloproteinases (KIM et al., 2007).

As evidências do potencial de regeneração das CEM vêm crescendo, porém uma questão importante no tratamento de lesões é aperfeiçoar a entrega das células, pois estudos demonstram que a

eficiência terapêutica das CEM é dependente do número de células entregue na lesão (FREYMAN et al., 2006; FALANGA et al., 2007). Para isso, é necessário a utilização de um arcabouço que permita a incorporação no tecido receptor liberando as células de maneira gradual.

#### 1.4.3. Arcabouço

O arcabouço é uma estrutura biocompatível, estável mecanicamente, que permite interações físicas e químicas nas três dimensões e é capaz de suportar o crescimento de células de diferentes tecidos (GRIFFITH; SWARTZ, 2006). No processo de reparo tecidual, o arcabouço tem como função manter e/ou liberar moléculas bioativas e células que auxiliem o reparo, além de possibilitar a infiltração e proliferação de células durante a formação de um novo tecido (KIM; BAEZ; ATALA, 2000). Ao mesmo tempo, o arcabouço deve se integrar ao tecido circundante ou degradar-se gradualmente dando espaço para o novo tecido, a fim de restaurar a estrutura e função (NELSON; BISSELL, 2006). Para atender todas essas características, a escolha do material utilizado no arcabouço é um grande desafio.

Os hidrogéis vêm sendo utilizados como potenciais arcabouços porque proporcionam um ambiente que permite o crescimento celular e a difusão de nutrientes através da rede porosa (JUNMIN ZHU, 2011). Os hidrogéis apresentam uma rede interconectada tridimensional com alto teor de água (> 99%) que permite o transporte de fatores solúveis, bem como o transporte de oxigênio. Além disso, apresentam outras vantagens, como o controle de parâmetros estruturais, biocompatibilidade e arquitetura variável (DRURY; MOONEY, 2003).

Os hidrogéis podem ser enquadrados em duas classes principais: hidrogéis naturais e sintéticos (LUTOLF; HUBBELL, 2005). Os hidrogéis sintéticos são formados por polímeros sintetizados em laboratório, sendo o polietilenoglicol (PEG) e o acetato de polivinila (PVA) os mais utilizados na área da engenharia de tecidos (ANNABI et al., 2010). A principal vantagem dos polímeros sintéticos está relacionada à facilidade de manipulação devido à composição química conhecida. Entretanto, os polímeros naturais oferecem a vantagem de se assemelharem à matriz extracelular, evitando a estimulação da inflamação crônica, reações imunológicas e toxicidade, muitas vezes detectadas no uso de polímeros sintéticos (HUBBELL, 1995; KIM; BAEZ; ATALA, 2000).

Os hidrogéis naturais utilizados como arcabouço são tipicamente formados por proteínas componentes da matriz extracelular

como o colágeno e o ácido hialurônico. O colágeno é a principal proteína da matriz extracelular, compreendendo 25% da massa total de proteínas na maioria dos mamíferos (DRURY; MOONEY, 2003). Além disso, ela é a principal proteína presente no tecido de granulação durante o processo de reparo da pele. Para o tratamento de feridas da pele estão disponíveis comercialmente arcabouços de colágeno obtidos de fontes bovinas (Integra<sup>®</sup>) ou suínas (Pelnac<sup>®</sup>), sendo indicados para o tratamento de feridas de espessura total (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

Da mesma forma, o ácido hialurônico, um polissacarídeo não linear que está presente em todos os tecidos dos invertebrados, é utilizado como componente de arcabouços apresentando efeitos na cicatrização de feridas e na angiogênese (WU et al., 2015). Por outro lado, também são utilizados materiais oriundos de outras fontes biológicas, como a quitosana e o alginato, que são polissacarídeos hidrofílicos assim como o ácido hialurônico (LEE; MOONEY, 2001, MANO et al., 2007).

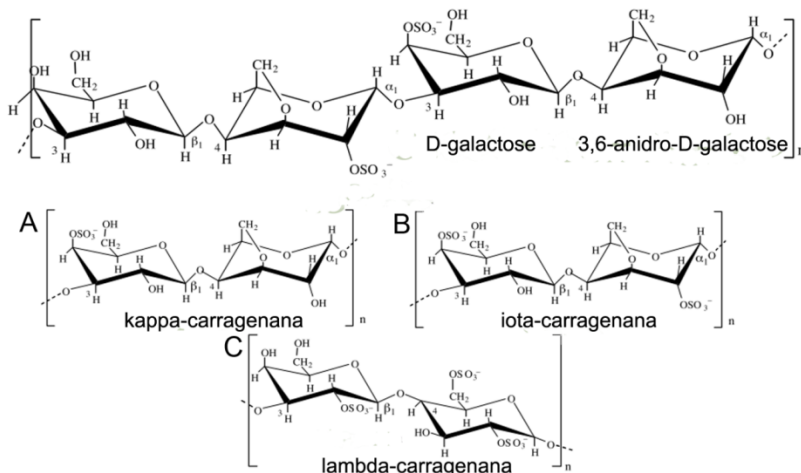
A quitosana é obtida pela deacetilação da quitina, um polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos. O hidrogel de quitosana apresenta ação coagulante, antibacteriana, anti-inflamatória e propriedades cicatrizantes (HAN, 2005). O hidrogel de alginato (polissacarídeo linear derivado da parede celular de algas), por sua vez, é amplamente utilizado no tratamento de lesões cutâneas que apresentam exsudatos, devido à propriedade coagulante e à capacidade de absorver uma quantidade de água equivalente a até 20 vezes o seu peso (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

Apesar de os hidrogéis naturais e sintéticos representarem uma grande variedade de materiais para utilização como arcabouço, torna-se importante o estudo de novos materiais de origem natural que atendam às diferentes necessidades no tratamento de lesões cutâneas, uma vez que ainda existem problemas clínicos e estéticos a serem resolvidos.

A carragenana é um polissacarídeo hidrofílico constituinte da matriz extracelular de diversas algas vermelhas (*Rhodophyceae*), principalmente dos gêneros *Eucheima* e *Kappaphycus* (TRONO, 1992), e representa uma interessante alternativa como arcabouço. Quimicamente, a carragenana é constituída por uma cadeia de dissacarídeos sulfatados composta pela repetição de D-galactose e resíduos de 3,6-anidro-D-galactose ligados em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (MANO et al., 2007). As formas mais comuns de carragenana são a  $\kappa$  (*kappa*),  $\iota$  (*iota*) e  $\lambda$  (*lambda*), as quais são classificadas de acordo com o número de grupos sulfatos por dissacarídeo: um grupo, dois e três

respectivamente (Figura 8) (MANO et al., 2007; VAN DE VELDE et al., 2002).

**Figura 8 - Estrutura química dos principais tipos de carragenana.**



Estrutura básica da carragenana: dissacarídeos sulfatados compostos pela repetição de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligados em  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Estrutura química da (A)  $\kappa$ -carragenana apresentando 1 grupo sulfato, (B)  $\iota$ -carragenana com 2 grupos sulfato e (C)  $\lambda$ -carragenana com 3 grupos sulfato (Imagem adaptada de MANO et al., 2007).

Em seu estado puro e seco, a carragenana apresenta-se sob a forma de um pó inodoro e sem sabor. No entanto, o polissacarídeo é solúvel em água quando aquecido e a polimerização do gel ocorre mediante a presença de eletrólitos ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ) (HAYASHI, 2007, 2001). Esses íons são capazes de neutralizar as cargas dos sulfatos e facilitar a aproximação das cadeias (Figura 9) (MICHEL; MESTDAGH; AXELOS, 1997; KARA et al., 2003).

As diferenças na composição do sulfato entre as carragenanas determinam as características reológicas (viscosidade, plasticidade e elasticidade) da amostra. As carragenanas do tipo  $\kappa$  e  $\iota$  apresentam a capacidade de formar géis devido ao formato tridimensional das duplas-hélices após a ligação dos grupos sulfato com os íons, enquanto a do tipo  $\lambda$  é somente um agente espessante, pois não é capaz de formar ligações cruzadas (*crosslinking*) entre as hélices (CAMPO et al., 2009).

Essas características são amplamente exploradas pela indústria alimentícia e farmacêutica que utilizam a carragenana como agente espessante, gelificante e estabilizante em diversas formulações (RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE et al., 2002). Na indústria alimentícia, as carragenanas podem ser utilizadas para melhorar a textura de queijos, para controlar a viscosidade e textura de pudins e como estabilizante em carnes processadas como hambúrgueres e salsichas (CAMPO et al., 2009).

A carragenana pode também apresentar diferentes atividades biológicas dependendo das características químicas, como massa molar, composição de sulfato e até mesmo do procedimento de extração. Por exemplo, as carragenanas do tipo  $\lambda$  são classicamente utilizadas em experimentos como agentes de indução inflamatória e dor (SILVA et al., 2010; MORRIS, 2003). Em contrapartida, as carragenanas do tipo  $\kappa$  e  $\iota$  apresentam diversas propriedades terapêuticas incluindo atividade antitumoral, imuno-modulatória e anticoagulante (YUAN et al., 2006; CAMPO et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Levando em consideração a variedade de propriedades reológicas, o uso amplamente difundido na indústria cosmética e alimentícia, bem como sua semelhança ao ambiente tecidual extracelular, a carragenana é uma alternativa de biomaterial a ser empregado na medicina regenerativa. A literatura já descreve o uso do hidrogel de carragenana como um arcabouço para encapsulamento de células ou liberação controlada de moléculas (MEHRBAN; SMITH; GROVER, 1999; SANTO et al., 2009; ROCHA et al., 2011; ANGULSKI, 2012; VARGHESE; CHELLAPPA; FATHIMA, 2014; MIHAILA et al., 2014).

Devido à enorme complexidade do processo de reparo cutâneo, não existem tratamentos que sejam capazes de restituir completamente a morfofisiologia de uma pele lesada. Diante dessa problemática, o presente trabalho buscou estabelecer um novo tratamento para lesões cutâneas utilizando dois componentes da engenharia de tecidos: células e arcabouço. Para realizar a entrega das CEM na lesão, foi utilizado o



hidrogel de carragenana como arcabouço, pois ele permite a formação de um sistema tridimensional, o qual mimetiza o ambiente 3D encontrado *in vivo* e representa um veículo versátil e de baixo custo. Esse modelo de tratamento busca minimizar as dificuldades encontradas nos tratamentos que utilizam a aplicação intradérmica ou subcutânea das células na borda da lesão, os quais apresentam grande variação nos resultados, pois dificultam a ação das células em outras áreas da lesão. Esse problema torna-se mais acentuado quando extrapolado para lesões extensas, como queimaduras em humanos. Nesse sentido, para avaliar os efeitos do tratamento com CEM encapsuladas no hidrogel de carragenana no processo de reparo foi utilizado o modelo de excisão total em murinos. Esse modelo permite o controle da profundidade da lesão, uma vez que a pele do camundongo é facilmente removida, além de envolver todos os componentes da derme e epiderme.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

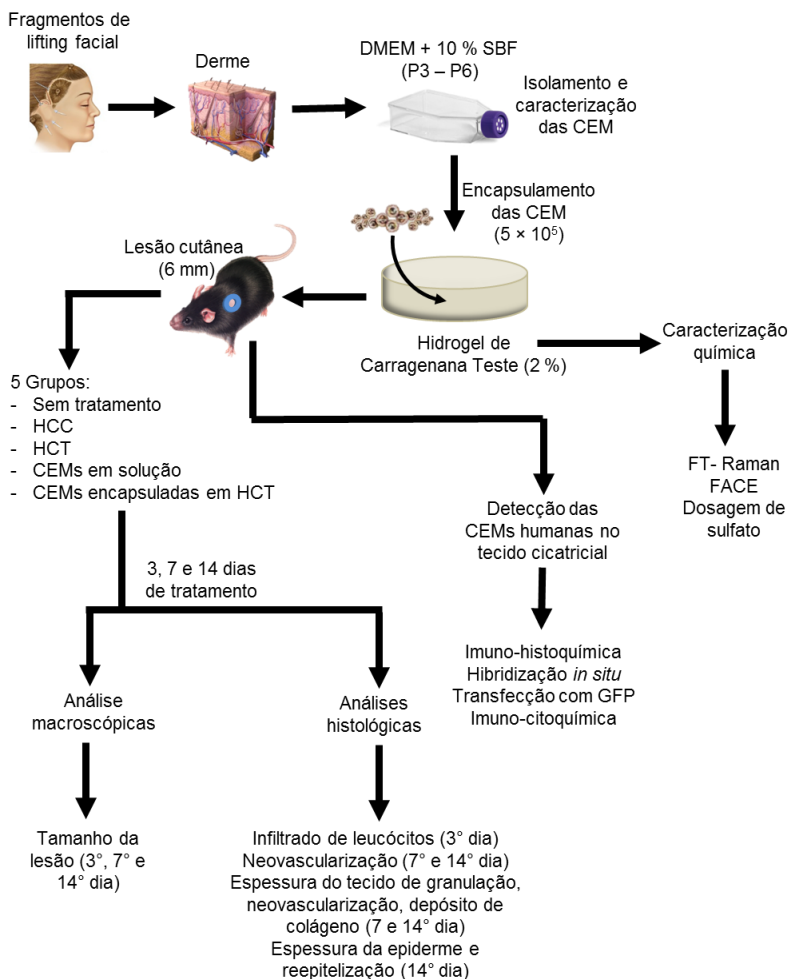
Avaliar o efeito das células estromais multipotentes humanas encapsuladas em hidrogel de carragenana da alga *Kappaphycus alvarezii*, no reparo de lesões cutâneas em modelo murino.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química da carragenana extraída da alga *Kappaphycus alvarezii*;
- Avaliar o efeito das células estromais multipotentes associadas ao hidrogel de carragenana da alga *K. alvarezii* no reparo cutâneo;
- Comparar o efeito das células estromais multipotentes associadas ao hidrogel de carragenana da alga *K. alvarezii* com o tratamento desses dois componentes isoladamente;
- Comparar o efeito do hidrogel de carragenana da alga *K. alvarezii* com o hidrogel de carragenana comercial do tipo *kappa* no reparo cutâneo;
- Verificar a presença das células estromais multipotentes humanas no tecido cicatricial murino.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. DESENHO EXPERIMENTAL



#### 3.2. EXTRAÇÃO DA CARRAGENANA DA ALGA *Kappaphycus alvarezii*

A carragenana foi obtida a partir de algas *Kappaphycus alvarezii* cultivadas na praia de Sambaqui, em Florianópolis. O cultivo das algas e a extração da carragenana foram realizados pela pesquisadora Dra. Leila

Hayashi responsável pelo Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para este trabalho, a carragenana foi extraída de algas em diferentes períodos do ano, a fim de minimizar as mudanças no tipo e na concentração da carragenana acarretadas pelo clima.

Para extração do pó de carragenana, as algas foram coletadas, lavadas com água do mar, secas em temperatura ambiente (TA) por 24 h e depois em estufa a 60°C até atingir o grau de umidade de 20 a 30 %. Em seguida, foi iniciado o pré-tratamento alcalino por meio da adição de 500 ml de hidróxido de potássio (KOH) (6 %) a 10 g de alga seca e picada. A mistura foi mantida em banho-maria a 80°C por 2 h, filtrada em musseline e então as algas foram lavadas em água corrente por 20 h. Para a extração alcalina, 10 g da alga foram embebidos em 500 ml de água destilada por 2 h em banho-maria a 80°C. As algas foram trituradas em água utilizando um *mixer* e voltaram para o banho-maria a 80°C por mais 2 h. Faltando 5 minutos para o fim da incubação, foram adicionados 30 g de celite (terra de diatomáceas) para auxiliar no processo de filtração. A filtração foi realizada em sistema de vácuo com utilização de papel filtro para separação das carragenanas (filtrado) dos resíduos da alga. Após a extração alcalina, foi realizada a secagem por precipitação alcoólica. Ao filtrado (500 ml), foi adicionado 1 l de álcool etílico. Para a precipitação das fibras de carragenana, foi adicionado uma solução de cloreto de potássio (KCl) 4 % diluído em água destilada quente. As fibras foram filtradas em musseline e secas em estufa a 60°C por 12 h.

A carragenana obtida por esta metodologia tem um custo de R\$ 35,00/Kg e foi denominada como “carragenana teste” ou CT. Paralelamente, foi utilizada uma carragenana do tipo *kappa* da empresa Sigma-Aldrich®, denominada neste estudo como “carragenana comercial” ou CC com um custo de R\$ 545,00/Kg.

### 3.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CARRAGENANA TESTE

A caracterização química da carragenana teste foi realizada pelo Laboratório de Análise de Glicoconjugados da Universidade Federal de Juiz de Fora, coordenado pelo professor Jair Adriano Kopke de Aguiar. Por meio dessas análises, foi possível comparar a composição de carboidratos e sulfato presentes na amostra de CT em relação à carragenana CC.

#### 3.3.1. Espectroscopia FT-Raman

Para identificar o perfil químico das amostras de CT e CC foi realizada uma análise espectroscópica por FT-Raman. Essa técnica permite detectar as variações na frequência da luz espalhada após a incidência sobre determinado material. A alteração na frequência é uma assinatura de cada material e permite a sua identificação química. As análises foram realizadas nas amostras secas de carragenana, em espectrômetro RFS-100 Bruker FT usando laser Nd:YAG com excitação em comprimento de onda de 1064 nm. Cada espectro foi realizado a partir de 500 varreduras com  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolução. Os espectros obtidos foram analisados na faixa de 600 a  $1500\text{ cm}^{-1}$ . A execução das análises e avaliação dos resultados foi realizada em colaboração com o Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### 3.3.2. Eletroforese de Carboidratos Assistida por Fluoróforo (FACE)

Para analisar a composição dos sacarídeos da CT e CC foi realizada a técnica FACE. Essa técnica permite a comparação do padrão de bandas dos produtos gerados pela hidrólise dos polissacarídeos após a eletroforese em gel de poliacrilamida, o que permite a comparação do perfil migratório.

As amostras foram preparadas por hidrólise ácida com ácido trifluoroacético 0,1 M (TFA) por 3 h a  $80^{\circ}\text{C}$ , posteriormente a solução foi neutralizada com NaOH em sistema de vácuo. Em seguida, passou por uma reação química na qual o sacarídeo reage com um composto fluorescente (2-aminoacridona - AMAC). A presença do marcador fluorescente permite a detecção dos sacarídeos com elevada sensibilidade quando os géis (eletrofluorogramas) são iluminados por luz ultravioleta (UV) e digitalizados por sistema de aquisição de imagens. Os derivados formados (sacarídeo-fluoróforo) foram então submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida em géis de alta densidade (20 a 36 %), para obtenção de separações com alta resolução.

### 3.3.3. Dosagem de Sulfato Inorgânico

Para dosar a quantidade de sulfato nas amostras de carragenana teste e comercial, foi utilizado o método descrito por Dodgson (1961) (DODGSON, 1961). As amostras foram hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) 8 M em estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  por 6 h. Posteriormente, o material foi evaporado em tubos de 5 ml e secos a vácuo sob hidróxido

de sódio (NaOH) para neutralização. Às amostras foi adicionado 1,4 ml de água e 0,5 ml do reagente de gelatina-BaCl<sub>2</sub> (0,5 % gelatina, 0,5 % cloreto de bário). As leituras de absorvância das amostras foram realizadas a 500 nm e os valores de sulfato foram calculados por meio da curva de calibração com sulfato de sódio (10 – 40 µg) também submetido à hidrólise ácida.

### 3.4. ASSOCIAÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MULTIPOTENTES (CEM) AO HIDROGEL DE CARRAGENANA TESTE (HCT)

#### 3.4.1. Isolamento da cultura primária a partir dos fragmentos de biopsia da derme

A obtenção de CEM da derme humana foi realizada através de fragmentos de pele excedentes de *lifting* facial contendo os anexos epidérmicos, provenientes de pacientes do Ilha Hospital e Maternidade de Florianópolis após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC sob o parecer de número 019874/2013 (Anexo B).

O protocolo de obtenção das CEM foi realizado conforme descrito por (JEREMIAS et al., 2014). Os fragmentos de pele excedentes de *lifting* facial foram acondicionados em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) até serem cortados em pedaços menores. Em seguida, foram mantidos durante 15 h em meio DMEM acrescido de 12,5 U/ml de dispase propiciando a dissociação do tecido. Após esse período, os fragmentos foram levados ao fluxo laminar, onde a epiderme, folículos e hipoderme foram retirados. Apenas a camada da derme foi incubada na enzima tripsina (0,25 %) a 37°C durante 45 min. A ação da tripsina foi inibida com meio DMEM + 10 % SBF e a solução contendo as células passada pelo filtro *cell strainer* (70 µm). O meio recolhido foi centrifugado (300 × g, 7 min), suspenso em 1 ml de meio DMEM + 10 % de SBF e toda a suspensão celular adicionada a uma garrafa de cultura (25 cm<sup>2</sup>) contendo 4 ml do mesmo meio. As células foram mantidas em garrafas de cultura em estufa a 37°C, contendo 5 % de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95 % de umidade, com a troca de meio ocorrendo a cada três dias. Ao atingirem 90 % de confluência, elas foram repicadas e adicionadas em uma nova garrafa. Nesse experimento, foram utilizadas passagens médias (P3 a P6).

### 3.4.2. Caracterização da população das CEM

#### 3.4.2.1. *Imunofenotipagem por meio de citometria de fluxo*

As células aderidas na garrafa de cultura foram dissociadas por meio da incubação com tripsina (0,05 %) a 37°C durante 2 min. A tripsina foi inibida com meio DMEM + 10 % SBF e a solução contendo as células foi centrifugada ( $300 \times g$ , 7 min). As células foram suspensas em PBS + 10% de SBF e incubadas a TA por 15 min. Em seguida, foram incubados com os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-CD90, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD34 (BD<sup>®</sup>) protegidos da luz, a 4°C por 1 h. As células foram centrifugadas a  $300 \times g$  por 7 min e suspensas em 100 µl de PBS. Em seguida foram analisadas através do citômetro de fluxo FACS Canto II no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o *Software Livre Flowing<sup>®</sup>*.

#### 3.4.2.2. *Diferenciação das CEM em fenótipos mesodermiais*

As CEM foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de  $10^5$  células/poço. Após as células atingirem 90% de confluência, o meio base (DMEM + 10% SBF) foi removido e os seguintes meios indutores foram adicionados:

- Meio indutor osteogênico: ácido ascórbico (50 µg/ml), dexametasona ( $10^{-8}$  M) e  $\beta$ - glicerolfosfato (3,15 mg/ml) em DMEM + 10 % SBF.

-Meio indutor adipogênico: dexametasona ( $10^{-8}$  M), isobutilmetilxantina (0,5 mM), insulina (2,5 µg/ml) e indometacina (100 µM) em DMEM + 10 % SBF.

O meio foi trocado a cada 3-4 dias e as amostras mantidas com o meio indutor por 21 dias. Após esse período, as células foram fixadas. A diferenciação osteogênica foi avaliada pelo método de coloração com vermelho de alizarina e a diferenciação adipogênica pela coloração com *Oil Red O*.

### 3.4.3. Preparo do hidrogel de carragenana

Para preparar o hidrogel de carragenana 2 % (m/v), o pó seco de carragenana (1 g) foi dissolvido em 50 ml de água ultrapura (MilliQ) e a mistura aquecida em banho-maria a 60°C por 30 min (com o auxílio de um *vortex*), até completa homogeneização. O hidrogel de carragenana obtido foi filtrado em membrana de 0,8 µm e autoclavado.

### 3.4.4. Encapsulamento das CEM no HCT

O procedimento de encapsulamento das CEM no HCT foi realizado como descrito por Angulski (2012) (ANGULSKI, 2012). O hidrogel foi plaqueado no fluxo laminar com volume de 250 µl/poço em placas *labtek* de 8 poços e após 1 min as células foram incorporadas ao hidrogel ainda em seu estado líquido. As células recuperadas foram suspensas em tampão fosfato salino (PBS) (40 µl contendo  $5 \times 10^5$  células) e homogeneizadas no hidrogel. O procedimento foi realizado sobre placa de aquecimento a 37°C, com a intenção de evitar a polimerização do gel. Para aumentar a estabilidade do gel, foi adicionado uma solução aquosa de KCl 5 %. Após 10 min, essa solução foi retirada e o poço lavado com PBS. A cultura foi mantida com DMEM + 10% SFB em estufa a 37°C, contendo 5 % de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95 % de umidade por 24 h até ser aplicada nos animais.

### 3.5. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REPARO TECIDUAL DA ASSOCIAÇÃO DAS CEM AO HCT

Para avaliar o reparo de lesões cutâneas de camundongos submetidos ao tratamento com CEM incorporadas ao HCT, foram realizadas análises de cinco grupos experimentais em três períodos de pós-operatório (3, 7 e 14 dias):

- 1) Grupo controle S/T: sem tratamento (6 animais por período);
- 2) Grupo controle HCC: tratamento com o hidrogel de carragenana comercial (3 animais por período);
- 3) Grupo controle HCT: tratamento com o hidrogel de carragenana teste (6 animais por período);
- 4) Grupo controle CEM: tratamento com  $5 \times 10^5$  CEM em 40 µl de solução salina (6 animais por período);
- 5) Grupo tratado CEM + HCT: tratamento com  $5 \times 10^5$  CEM encapsuladas em HCT (6 animais por período).

#### 3.5.1. Animais

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob o parecer de número PP00810 (Anexo C). Os experimentos foram realizados com 81 camundongos da linhagem isogênica C57BL/6 (*Mus musculus*), machos e fêmeas, com aproximadamente 150 dias, obtidos a partir de reprodução controlada



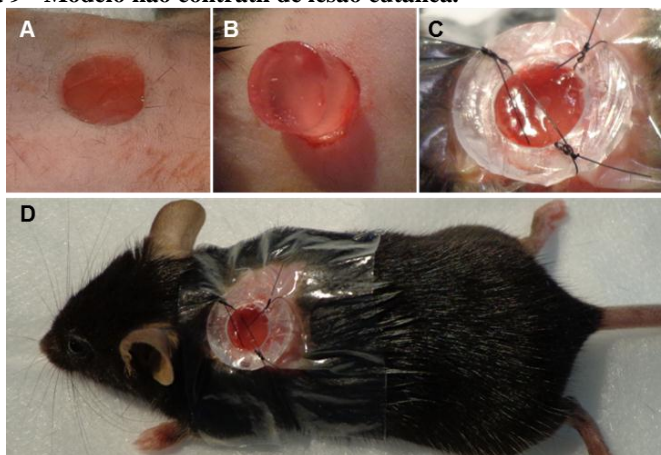
realizada no biotério setorial do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) - UFSC.

Os animais foram mantidos conforme recomendações reconhecidas internacionalmente para a criação e o manejo de animais para pesquisa. Sendo assim, os camundongos foram mantidos em caixas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, a temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e 60 % de umidade do ar), recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

### 3.5.2. Procedimento cirúrgico

Todos os animais foram submetidos a procedimento anestésico prévio, com administração por via subcutânea (60  $\mu\text{l}$ /animal) de cetamina 10 % (100-150 mg/kg) e xilazina 2 % (10-15 mg/kg). O animal foi considerado anestesiado quando houve perda de qualquer reação motora pela preensão do coxim adiposo da pata dianteira. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear e assepsia da pele com álcool 70 %. O dorso foi escolhido para ser feita a lesão, pois evita o autocanibalismo. Os procedimentos cirúrgicos foram baseados no modelo experimental não contrátil descrito por Wang (2013) e estão apresentados na Figura 10 (WANG et al., 2013).

**Figura 9 - Modelo não contrátil de lesão cutânea.**



(A) Excisão da pele (6 mm de diâmetro) realizada no dorso de camundongos C57BL6. (B) Aplicação tópica dos tratamentos no local da lesão. (C e D)

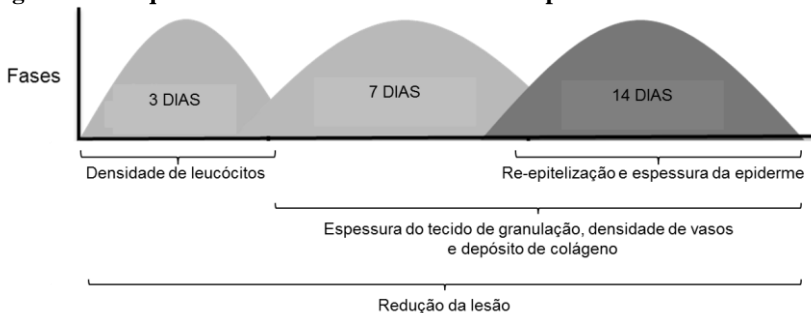
Recobrimento da lesão com o curativo tópico Tegaderm® e sutura de um anel de silicone.

O procedimento de excisão da pele foi realizado com o auxílio de um *punch* de 0,6 cm de diâmetro, deixando exposta a fáscia muscular. Em seguida, foram aplicados o tratamento e o curativo tópico Tegaderm® (3M). Antes da aplicação nos animais, todos os hidrogéis foram previamente lavados e mantidos em PBS até aplicação no animal (tempo máximo de 1 h). Por fim, com fio monofilamentado de náilon 6-0, foi feita a sutura de um anel de silicone às bordas da lesão, utilizando-se três pontos simples, a fim de diminuir variações decorrentes da contração da ferida, visto que os resultados podem ser afetados pela movimentação e postura do animal. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em caixas individuais. Os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub> para coleta do tecido cicatricial e análise dos parâmetros morfométricos e histológicos.

### 3.5.3. Estudo do processo de reparo

As análises foram realizadas conforme apresentado na Figura 11: (1) a redução no tamanho da lesão foi avaliada durante todo o período experimental; (2) a densidade de leucócitos foi avaliada somente durante a fase inflamatória (3º dia); (3) o tecido de granulação, a densidade de vasos e do depósito de colágeno foram avaliados no 7º e 14º dias; (4) a reepitelização e a espessura de epiderme foram avaliadas somente no último período experimental (14º dia).

**Figura 10 - Esquema das análises macro e microscópicas.**



### 3.5.4. Estudo macroscópico da lesão

Para determinar a redução da lesão, as feridas foram fotografadas logo após o procedimento de eutanásia (3, 7 e 14 dias de pós-operatório). A partir das fotografias, foi realizada pelo *software ImageJ* a medida do maior e menor diâmetro das lesões e em seguida calculado o diâmetro médio da lesão.

### 3.5.5. Processamento das amostras para estudo histológico

O tecido cicatricial coletado após cada período de tratamento foi fixado em solução de paraformaldeído 4 %, por 24 h a 4°C. Em seguida, as amostras fixadas foram desidratadas pela passagem em séries de etanol crescente (70, 90 e 100° GL), diafanizadas em xilol, incluídas em parafina e submetidas à microtomia (cortes de 5 µm). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise do infiltrado inflamatório, tecido de granulação, reepitelização e densidade de vasos sanguíneos. Para estudo das fibras colágenas os cortes foram corados com Mallory e imunomarcados com anticorpo anti-colágeno I. As colorações foram realizadas no sistema de coloração de lâminas (Leica AutoStainer XL) disponível no Laboratório Multiusuário de Estudo em Biologia II (LAMEB II - UFSC). As lâminas histológicas foram visualizadas no microscópio Olympus BX41 com câmera Olympus SC30 utilizando o *software AnalySIS* para captura das imagens.

#### 3.5.5.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina

Para a realização da análise histológica do tecido pela coloração com HE, as amostras foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série decrescente de álcool (100, 80 e 70° GL) e lavadas em água destilada. Logo após, coradas com Hematoxilina durante 3 min, lavadas com água destilada e coradas com Eosina durante 10 min. As amostras foram então lavadas e desidratadas em série crescente de álcool (70, 80 e 100° GL), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan.

#### 3.5.5.2. Coloração de Mallory

A avaliação do depósito de matriz extracelular e a formação das fibras de colágeno foram realizadas pela coloração de Mallory. Para isso, as amostras foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série decrescente de álcool (100, 80 e 70° GL) e lavadas em água destilada. Logo após, as lâminas foram coradas com o corante Mallory durante 30 min e lavadas com água destilada. As amostras foram então desidratadas

em série crescente de álcool (70 e 100° GL), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan.

### 3.5.5.3. Imuno-histoquímica

Para a realização do ensaio de imuno-histoquímica, as lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série decrescente de álcool (100, 90 e 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada por calor, pela incubação em tampão citrato, pH 6,0 a 93-96°C, por 40 min. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (6 %) em metanol. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de PBS acrescido de 5 % de leite em pó desnatado, durante 30 min. As amostras foram incubadas com o anticorpo primário anti-colágeno I na diluição 1:300 (Abcam) durante 14 h, em câmara úmida, a 4°C. As amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG1 de coelho) conjugado à biotina durante 1 h a TA e, após, foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase. Após a incubação, as amostras foram marcadas com diaminobenzidina-3,3' (DAB) durante 5 min e contra coradas com hematoxilina por 2 min. As amostras foram então desidratadas em série crescente de álcool (70, 80 e 100° GL), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan.

### 3.5.6. Avaliação do infiltrado inflamatório

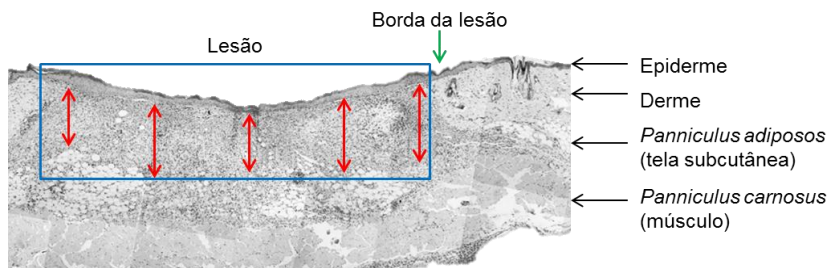
Para quantificação do infiltrado inflamatório, foram adquiridas 10 imagens no aumento de 400× na região da lesão de 1 lâmina/animal no 3° dia de pós-operatório. Utilizando o *Plugin Cell Counter* do *software ImageJ*®, foi possível contar o número de leucócitos presentes na lesão. A média final encontrada representa a quantidade de leucócitos encontrados por campo.

### 3.5.7. Determinação da espessura do tecido de granulação

A análise da espessura do tecido de granulação foi realizada em 1 lâmina/animal corada com HE nos períodos de 7 e 14 dias de pós-operatório. Para a quantificação da espessura do tecido de granulação, foram adquiridas imagens no aumento de 40× abrangendo toda a área da lesão. Utilizando o *Plugin MosaicJ* do *software ImageJ*®, as imagens foram montadas em série, em seguida foram realizadas 5 medições

lineares da espessura do tecido de granulação conforme indicado na Figura 12.

**Figura 11 - Estruturas da pele e identificação do tecido de granulação na lesão cutânea em lâmina histológica.**



Corte histológico da lesão, onde podem ser observadas a epiderme, derme, hipoderme e músculo. A seta verde indica a borda da lesão. A região indicada pelo retângulo azul representa a lesão e a formação do novo tecido. As setas vermelhas indicam as 5 medidas lineares da espessura do tecido de granulação.

### 3.5.8. Avaliação da angiogênese

A análise da densidade vascular foi realizada em 1 lâmina/animal corada com HE nos períodos de 7 e 14 dias de pós-operatório. Para a análise quantitativa da angiogênese, foram capturadas 5 imagens em aumento de 200× dos locais com maior densidade vascular (*hot spots*) na região da lesão. Foi utilizado o *Plugin Cell Counter* do software *ImageJ*® para contagem dos vasos sanguíneos. A média final encontrada representa a quantidade de vasos encontrados por campo indicada como densidade de vasos.

### 3.5.9. Avaliação do depósito de colágeno

Para quantificação histológica do depósito de colágeno, foi analisada 1 lâmina/animal corada com Mallory nos períodos de 7 e 14 dias. Foram capturados 8 campos em aumento de 400× de cada lâmina, sendo 3 campos na derme íntegra e 5 campos na região da lesão. Foi utilizado o *Plugin Colour Deconvolution* do software *ImageJ* para separar a cor azul nas imagens. Esse *plugin* reconhece as cores da imagem e as decompõe em três cores: azul (colágeno), vermelho (fibras musculares) e amarelo (hemácias). Em seguida por meio da opção *Measure*, foi obtido o valor referente à intensidade de cor/pixels da

imagem azul. A partir dos valores obtidos, foi calculada a intensidade relativa de cor azul em relação ao tecido íntegro (Equação 1).

**Equação 1 - Intensidade relativa da cor azul (colágeno).**

$$\text{Intensidade relativa da cor azul} = \frac{\text{Intensidade da pele íntegra}}{\text{Intensidade da lesão}}$$

### 3.5.10. Avaliação da reepitelização

A avaliação da reepitelização foi realizada através da espessura da epiderme e da medida linear da lesão sem epiderme em 1 lâmina/animal corada com HE no período 14 dias de pós-operatório. Para a quantificação da espessura da epiderme foram adquiridas imagens no aumento de 200×. Utilizando o *software ImageJ*<sup>®</sup>, foram realizadas 5 medições lineares da espessura. Para a quantificação da reepitelização foram adquiridas imagens no aumento de 40× de toda a área da ferida. Utilizando o *software ImageJ*<sup>®</sup>, foi realizada a medição linear da região sem epiderme.

## 3.6. DETECÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MULTIPOTENTES (CEM) HUMANAS NO TECIDO CICATRICIAL MURINO

Para verificar a presença das células humanas no tecido cicatricial murino foram realizadas biopsias do tecido cicatricial de animais que receberam tratamento com CEM encapsuladas em HCT (conforme descrito no item 3.3.4) após 12, 24 e 72h de pós-operatório. Em seguida, os fragmentos do tecido cicatricial foram cortados em pedaços menores e mantidos durante 45 min em tripsina (0,25%) à 37°C. A ação da tripsina foi inibida com meio DMEM + 10% SBF e a solução contendo as células passada pelo filtro *cell strainer* (70 µm). O meio recolhido foi centrifugado (300 × g, 7 min), suspenso em 2 ml de meio DMEM + 10% de SBF e toda a suspensão celular adicionada a placas de 24 poços, contendo 500 µl de suspensão em cada poço. As células foram mantidas em cultura durante 6 dias na estufa a 37°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade, com a troca de meio ocorrendo a cada três dias.

A cultura das células recuperadas do tecido cicatricial e de células humanas (controle positivo) foram fixadas em paraformaldeído 4 % por 1 h a TA. Após, os sítios inespecíficos foram bloqueados e as células permeabilizadas com solução de PBS acrescido de 5 % de SBF e 0,25 %

de *Triton* durante 40 min. As amostras foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal antinúcleo humano (1:50) (MAB1281, Millipore), durante 1 h à TA. Em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário Alexa 488 (Goat antimouse, IgG1), durante 1 h à TA. Após a incubação, as amostras foram marcadas com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante 2 min e visualizadas em microscópio Olympus IX71. As imagens foram capturadas com a câmera Olympus DP71.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram avaliados por meio da análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de múltipla comparação de médias de Bonferroni. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software estatístico *GraphPad Prism*<sup>®</sup>.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CARRAGENANA TESTE

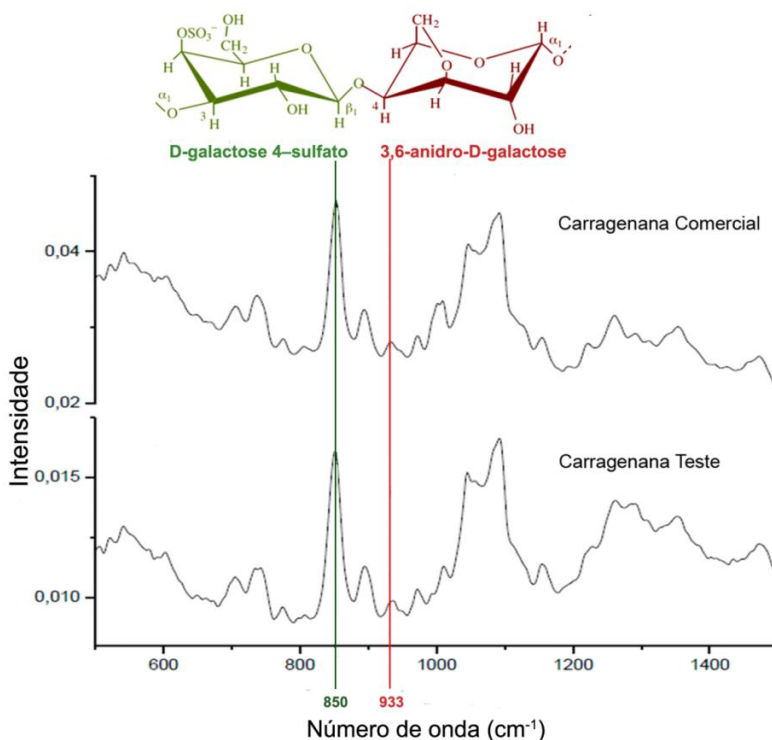
As características químicas da carragenana extraída da alga *Kappaphycus alvarezii*, denominada neste trabalho como carragenana teste (CT), foram inicialmente comparadas com uma carragenana comercial (CC) do tipo *kappa* da marca Sigma®. Foram realizadas as seguintes análises: (1) identificação da classe da carragenana por espectroscopia de FT-Raman; (2) comparação dos sacarídeos constituintes por eletroforese de carboidratos assistida por fluoróforo (FACE), e; (3) dosagem de sulfato inorgânico por um método colorimétrico.

Inicialmente, foi realizada a identificação da classe das carragenanas por meio de espectroscopia FT-Raman, onde o espalhamento da luz, após a sua incidência sobre a amostra, define as características intrínsecas de cada classe. Assim, o tipo de carragenana ( $\kappa$ ,  $\iota$  e  $\lambda$ ) é definido a partir do espectro na região de 600 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  (PEREIRA et al., 2003). Carragenanas do tipo *kappa* ( $\kappa$ ) apresentam uma banda forte em 845  $\text{cm}^{-1}$  e outra fraca em 930  $\text{cm}^{-1}$  que são atribuídas à presença de D-galactose-4-sulfato e 3,6-anidro-D-galactose, respectivamente. Carragenanas do tipo *iota* ( $\iota$ ), por sua vez, apresentam uma banda forte em 845  $\text{cm}^{-1}$  e outra fraca em 930  $\text{cm}^{-1}$ , além de um sinal característico em 805  $\text{cm}^{-1}$ , referente aos dois grupos sulfato da molécula. Finalmente, carragenanas do tipo *lambda* ( $\lambda$ ) apresentam uma banda larga entre 820 e 830  $\text{cm}^{-1}$ , referente a uma maior quantidade de grupos sulfato (PEREIRA et al., 2003).

Os espectros de FT-Raman obtidos demonstram que a CT e a CC apresentam uma grande semelhança no perfil de bandas, com uma banda forte em 850  $\text{cm}^{-1}$  e outra mais fraca em 933  $\text{cm}^{-1}$ , indicando serem do tipo *kappa* (Figura 13).



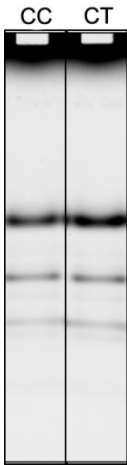
**Figura 12 - Espectro FT-Raman da carragenana comercial e da carragenana teste na região de 600 a 1500  $\text{cm}^{-1}$ .**



A linha verde indica a banda forte em 850  $\text{cm}^{-1}$  referente à D-galactose 4-sulfato e a linha vermelha indica a banda fraca em 933  $\text{cm}^{-1}$  referente à 3,6-anidro-D-galactose.

Em seguida, foi realizada a técnica FACE para a comparação da composição de sacarídeos entre a CT e a CC. Por meio dessa técnica, foi possível comparar o padrão de migração dos sacarídeos em gel de poliacrilamida após hidrólise ácida com o ácido trifluoroacético (TFA). Os resultados obtidos mostraram que o padrão de migração dos produtos gerados após a hidrólise ácida foi o mesmo para ambas as amostras, com a presença de duas bandas principais (mais intensas) (Figura 14). Tais resultados indicam que os sacarídeos obtidos a partir da CT e da CC apresentam o mesmo peso molecular, confirmando que elas pertencem à mesma classe, ou seja, do tipo *kappa*.

**Figura 13 - Eletroforese de carboidratos assistida por fluoróforo (FACE) dos sacarídeos hidrolisados da carragenana comercial (CC) e da carragenana teste (CT).**



Finalmente, foi realizada a dosagem de sulfato por uma análise colorimétrica. Inicialmente, foi estabelecida uma curva padrão de sulfato de sódio (10 – 40 µg;  $R^2=0,9914$ ) que serviu de referência para o cálculo da porcentagem de sulfato nas duas amostras testadas (Tabela 1). A CT apresentou uma concentração de sulfato de 35,25 %, sendo maior do que a apresentada pela CC (32,04 %). Interessantemente, os valores obtidos em ambas as amostras foi superior ao valor teórico de 22 % de sulfato esperado para a carragenana do tipo *kappa* (RUITER; RUDOLPH, 1997). Em conjunto, os resultados obtidos indicam que a carragenana extraída da alga *K. alvarezii* pertence ao tipo *kappa* e que apresenta características químicas semelhantes as carragenanas comerciais dessa classe.

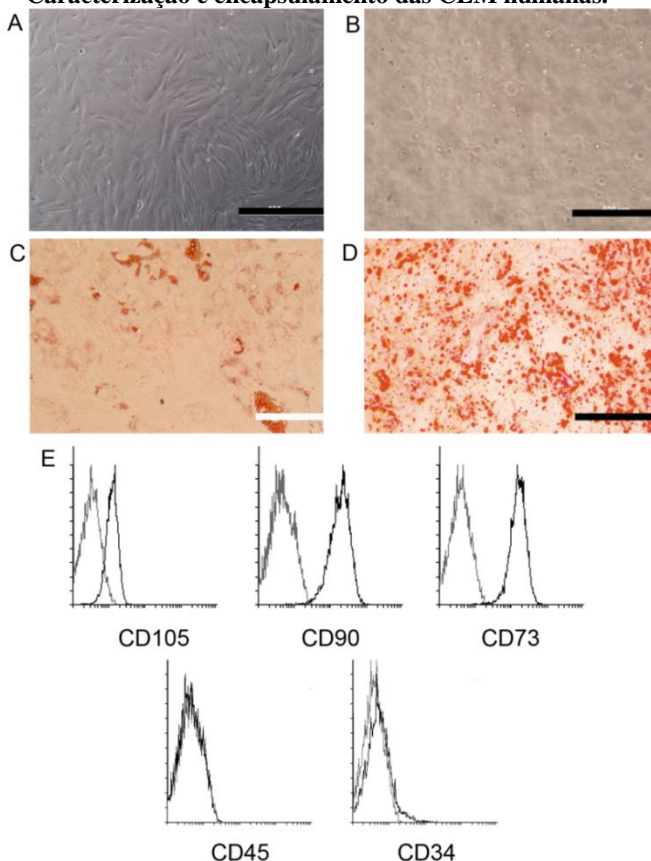
**Tabela 1 - Porcentagem de sulfato das amostras de carragenana.**

Amostra	Carragenana (µg)	Sulfato (µg)	Sulfato (%)
Comercial	90	28,83	32,04
Teste	90	31,72	35,25

4.2. ASSOCIAÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MULTIPOTENTES (CEM) AO HIDROGEL DE CARRAGENANA TESTE (HCT)

As CEM derivadas da derme humana utilizadas neste estudo apresentaram aderência ao plástico (Figura 15A), potencial de diferenciação adipogênico (Figura 15C) e osteogênico (Figura 15D) sob indução de determinados meios e um padrão específico de expressão de antígenos de superfície ( $CD105^+$ ,  $CD90^+$ ,  $CD73^+$ ,  $CD34^+$  e  $CD45^-$ ) (Figura 15E). Essas características foram utilizadas como critério para identificação das CEM e indicaram um perfil semelhante a célula tronco estromal multipotente (DOMINICI et al., 2006). Quando encapsuladas no hidrogel de carragenana teste, as CEM apresentaram morfologia arredondada (Figura 15B), conforme descrito por Angulski (2012) (ANGULSKI, 2012).

**Figura 14 – Caracterização e encapsulamento das CEM humanas.**



(A) Microscopia de contraste de fase evidenciando a morfologia fibroblastóide das células aderidas ao plástico. (B) CEM encapsuladas em hidrogel de carragenana apresentando morfologia arredondada. (C) Coloração com Oil Red O para confirmar a diferenciação adipogênica. Em vermelho, acúmulo de lipídeos. (D) Coloração com Ailzarin Red S para confirmar a diferenciação osteogênica. Em vermelho, depósito de cálcio. (E) Perfil de expressão dos antígenos de superfície. Linha cinza: população negativa. Linha preta: amostra das CEM. As CEM apresentaram presença dos marcadores CD105, CD90 e CD73 e a ausência dos marcadores CD45 e CD34. Escala preta: 500  $\mu$ m. Escala branca: 100  $\mu$ m.

#### 4.4. POTENCIAL DE REPARO CUTÂNEO

O potencial de reparo das CEM encapsuladas em HCT no tratamento de lesões cutâneas de espessura total em modelo murino foi avaliado comparativamente em relação aos seguintes grupos experimentais: S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste e CEM= células estromais multipotentes em solução. As amostras do tecido cicatricial foram recuperadas no 3º, 7º e 14º dia de pós-operatório.

Para avaliar o efeito dos tratamentos, foram analisados tanto parâmetros macroscópicos quanto histológicos. A análise macroscópica foi realizada em todos os períodos experimentais pela quantificação do tamanho da lesão. Posteriormente, foram realizadas análises histológicas avaliando os seguintes parâmetros: (1) densidade de leucócitos no 3º dia de pós-operatório, (2) espessura do tecido de granulação, densidade de vasos e depósito de colágeno no 7º e 14º dia de pós-operatório e (3) reepitelização e espessura da epiderme no último período experimental (14º dia).

##### 4.4.1. Análise macroscópica

Inicialmente, foi avaliada a redução no tamanho da lesão (contração) por meio da comparação entre o diâmetro médio das lesões de cada grupo, sendo esse parâmetro considerado um indicativo do potencial cicatrizante do tratamento. Como critério para inclusão dos animais foi realizado uma avaliação dos sinais de infecção bacteriana (pus). Todos os animais apresentaram exsudato moderado e ausência de pus.

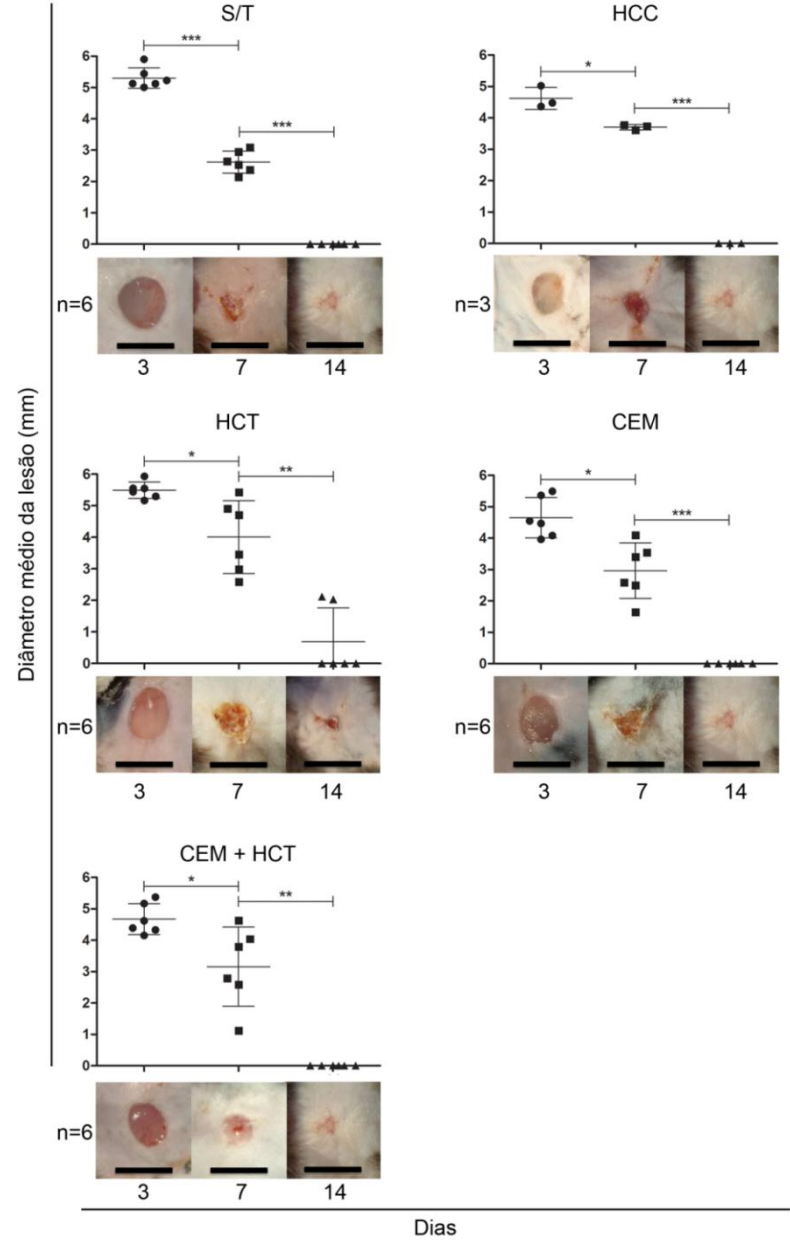
A comparação do diâmetro médio das lesões entre os grupos (por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni) no 3º dia de pós-operatório mostrou uma diminuição no tamanho da lesão dos grupos

CEM + HCT ( $4,57 \pm 0,49$  mm), CEM ( $4,65 \pm 0,64$  mm) e HCC ( $5,08 \pm 0,06$  mm) em relação ao grupo S/T ( $5,30 \pm 0,29$  mm). Por outro lado, apenas os grupos CEM + HCT e CEM apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle HCT ( $5,49 \pm 0,26$  mm). O grupo HCT inclusive apresentou a menor redução da ferida.

Em relação ao 7º dia pós-operatório, os grupos não apresentaram diferenças entre si, sendo que o grupo S/T apresentou o menor diâmetro médio ( $2,62 \pm 0,35$  mm), seguido pelos grupos CEM ( $2,96 \pm 0,88$  mm), CEM + HCT ( $3,15 \pm 1,26$  mm), HCC ( $3,7 \pm 0,08$  mm) e por último o grupo HCT ( $4,00 \pm 1,15$  mm). Sendo o grupo HCT novamente o que apresentou a menor redução na ferida. Quanto ao 14º dia de pós-operatório, todos os grupos, exceto o HCT ( $0,69 \pm 1,07$ ), apresentaram fechamento total da lesão. Além disso, a análise temporal dos resultados entre o 3º e 7º dia de pós-operatório mostrou que o grupo S/T apresentou uma evolução mais rápida no fechamento da lesão ( $p < 0,001$ ) (Figura 16).

Tomados em conjunto, esses resultados indicam que os grupos com CEM apresentaram melhora no fechamento da lesão no 3º dia de pós-operatório quando comparados ao grupo S/T, entretanto não apresentam melhora nos períodos finais (7º e 14º dia) o que não torna evidente o potencial cicatrizante. Por outro lado, esse potencial aumenta quando comparados ao grupo HCT, visto que este grupo apresentou os piores resultados.

**Figura 15 – Redução no tamanho da lesão (diâmetro médio) nos 3 períodos de pós-operatório.**



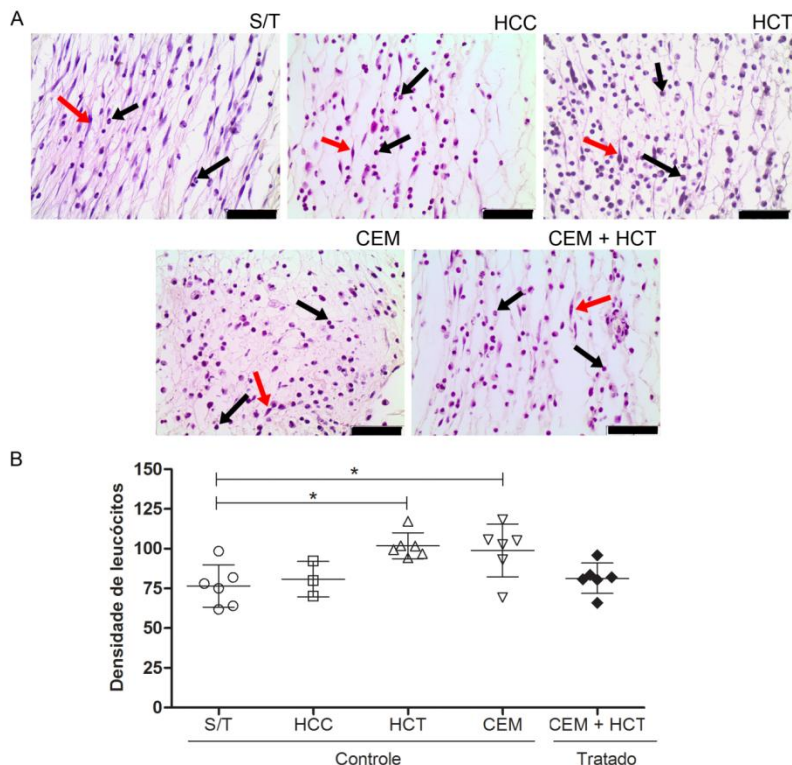
Representação gráfica do diâmetro médio das lesões. Os valores representam as médias do diâmetro para cada animal  $\pm$  desvio padrão. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$  por teste t pareado. Imagens representativas do tecido cicatricial. Escala: 6 mm. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas.

#### 4.4.2. Infiltrado inflamatório

O processo de reparo tecidual tem início com a migração de células inflamatórias para a lesão, portanto esse foi o primeiro parâmetro avaliado no estudo histológico. Essa avaliação foi realizada através da análise de lâminas coradas com HE após 3 dias de pós-operatório (Figura 17A). Para tanto, foi contado o número de leucócitos infiltrantes em 10 campos da lâmina histológica, sendo a média/animal indicada como densidade de leucócitos.

Os resultados obtidos mostram um aumento significativo ( $p<0,05$ ) na densidade de leucócitos infiltrantes nos grupos HCT ( $101,82 \pm 8,11$ ) e CEM ( $98,94 \pm 16,60$ ) em relação ao grupo S/T ( $76,52 \pm 13,30$ ). Ademais, os grupos HCC ( $80,79 \pm 11,08$ ) e tratado com CEM + HCT ( $81,35 \pm 9,55$ ) não apresentaram diferença em relação ao controle S/T (Figura 17B). Esses resultados indicam uma provável atividade das CEM sobre a migração dos leucócitos na presença do HCT, uma vez que a densidade de leucócitos foi diminuída quando comparada aos grupos HCT e CEM.

**Figura 16 - Densidade de leucócitos infiltrantes nas lesões cutâneas no 3º dia de pós-operatório.**



(A) Imagens representativas de cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina. As setas pretas indicam os leucócitos e as setas vermelhas indicam os fibroblastos. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas. Escala: 50  $\mu$ m. (B) Representação gráfica da densidade de leucócitos infiltrantes. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão (n= 6 para S/T, HCT, CEM e CEM+HCT; n= 3 para HCC (10 campos/animal). \*  $p < 0,05$  por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

#### 4.4.3. Tecido de granulação

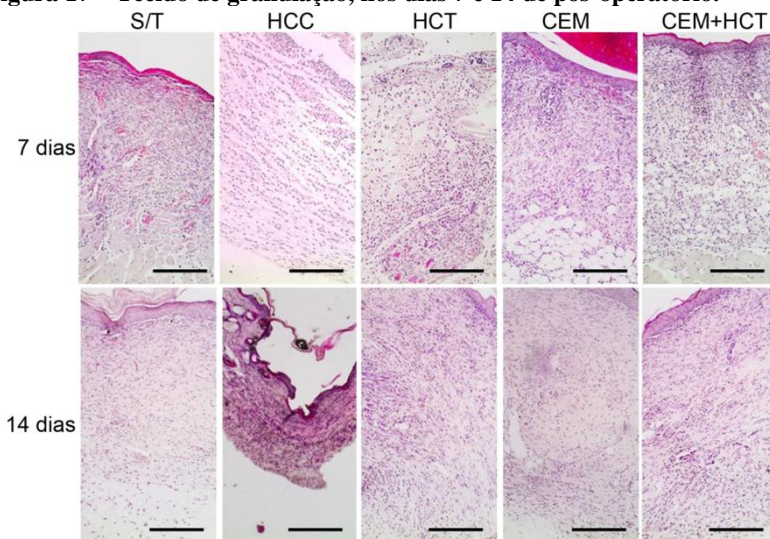
O tecido de granulação é formado na fase proliferativa sendo basicamente composto por leucócitos, fibroblastos, colágeno e vasos sanguíneos (GREAVES et al., 2013). Sendo assim, nos dias 7 e 14 de pós-operatório foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) a espessura



do tecido de granulação, 2) a neovascularização e 3) o depósito de colágeno.

A espessura do tecido de granulação durante o processo de reparo tecidual foi avaliada por análise histológica de lâminas coradas com HE (Figura 18). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 19. Foi observado que todos os grupos analisados não apresentaram diferença no 7º dia de pós-operatório. No entanto, os resultados mostram um aumento na formação do tecido de granulação nos grupos CEM ( $0,65 \pm 0,15$  mm), HCC ( $0,73 \pm 0,17$  mm), CEM + HCT ( $0,83 \pm 0,41$  mm) e HCT ( $0,87 \pm 0,12$  mm) quando comparados ao grupo controle S/T ( $0,59 \pm 0,17$  mm) no 7º dia.

**Figura 17 – Tecido de granulação, nos dias 7 e 14 de pós-operatório.**

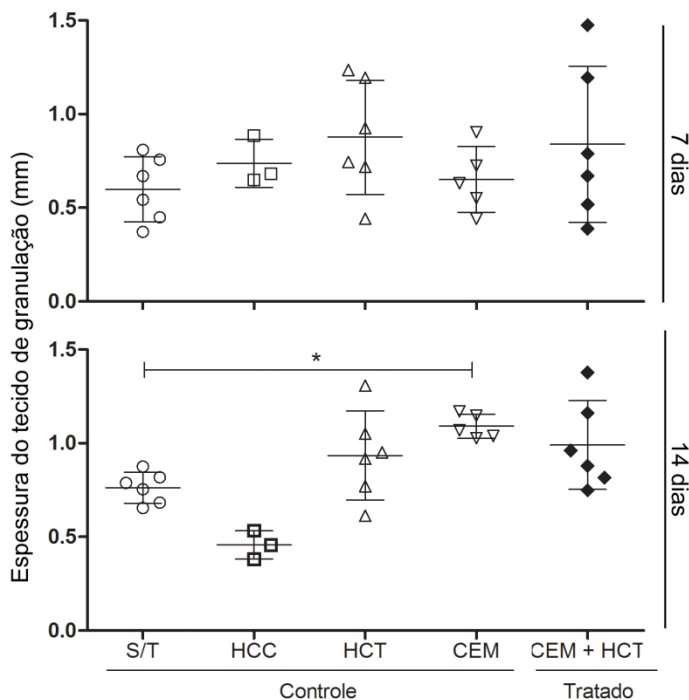


Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas. Escala: 200  $\mu$ m.

Além disso, os resultados obtidos no 14º dia mostraram uma espessura cerca de 2 vezes menor no grupo controle HCC ( $0,45 \pm 0,07$  mm) em relação aos demais. Por outro lado, a espessura do tecido de granulação manteve-se aumentada nos grupos HCT ( $0,93 \pm 0,23$  mm), CEM + HCT ( $0,99 \pm 0,23$  mm) e CEM ( $1,09 \pm 0,05$  mm) e em relação ao grupo S/T ( $0,76 \pm 0,08$  mm).

De maneira geral, os resultados obtidos indicam uma tendência de aumento na espessura do tecido de granulação dos grupos que receberam tratamento em relação ao grupo S/T no primeiro período analisado (7 dias), tornando-se mais evidente no 14º dia nos grupos HCT, CEM e CEM + HCT. Além disso, não foi observada a presença de células gigantes multinucleadas o que indica que os macrófagos foram capazes de fagocitar os hidrogéis de carragenana.

**Figura 18 - Espessura do tecido de granulação nos dias 7 e 14 de pós-operatório.**

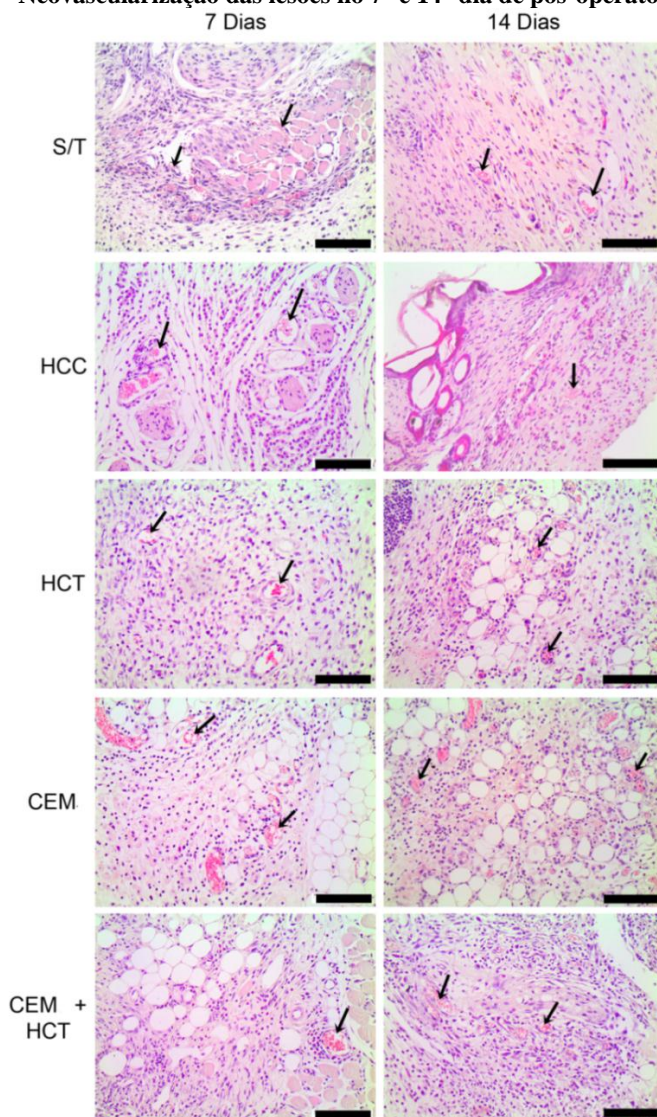


Representação gráfica da espessura do tecido de granulação. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=6$  para S/T, HCT e CEM+HCT;  $n=5$  para CEM e  $n=3$  para HCC. Foram realizadas 5 medidas por animal. \*  $p<0,05$  por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas.

Em seguida, foi avaliada a formação de novos vasos durante o processo de reparo. A análise da neovascularização foi realizada pela

contagem dos vasos sanguíneos nas lâminas histológicas coradas com HE (Figura 23). Para tanto, foi contado o número de vasos de 5 *hot spots* (loais com maior densidade vascular) no tecido de granulação em cada lâmina histológica, sendo a média/animal indicada como densidade de vasos.

**Figura 19 – Neovascularização das lesões no 7º e 14º dia de pós-operatório.**

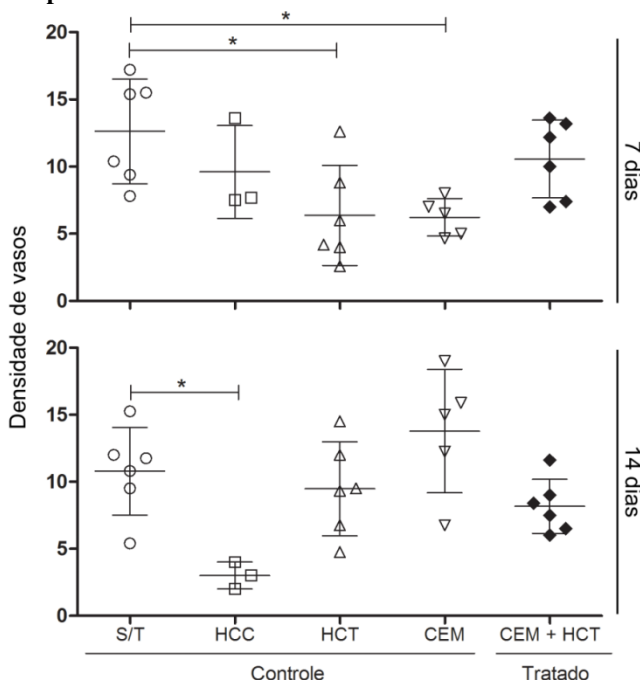


Imagens representativas de cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina. As setas pretas indicam os vasos sanguíneos. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas. Escala: 100  $\mu$ m.

A análise dos dados obtidos (Figura 24) mostrou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na densidade de vasos no 7º dia de pós-operatório nos grupos HCT ( $6,36 \pm 3,72$  vasos/campo) e CEM ( $6,23 \pm 1,39$  vasos/campo) em relação ao grupo S/T ( $12,66 \pm 3,93$  vasos/campo). Comparativamente, o grupo tratado com CEM + HCT ( $10,56 \pm 2,89$  vasos/campo) e o grupo HCC ( $9,6 \pm 3,46$  vasos/campo) não apresentaram diferenças em relação aos demais grupos.

No 14º dia, foi observado um aumento na densidade de vasos no grupo CEM ( $13,78 \pm 4,60$  vasos/campo) em comparação com o período anterior. Além disso, o grupo HCC ( $3 \pm 0,91$  vasos/campo) apresentou uma diminuição ( $p < 0,05$ ) na densidade dos vasos em relação ao grupo S/T. Os grupos CEM + HCT ( $8,16 \pm 2,09$  vasos/campo) e HCT ( $9,47 \pm 3,50$  vasos por campo) não apresentaram diferença em relação aos demais grupos.

**Figura 20 - Densidade de vasos sanguíneos nas lesões cutâneas no 7º e 14º dia de pós-operatório.**



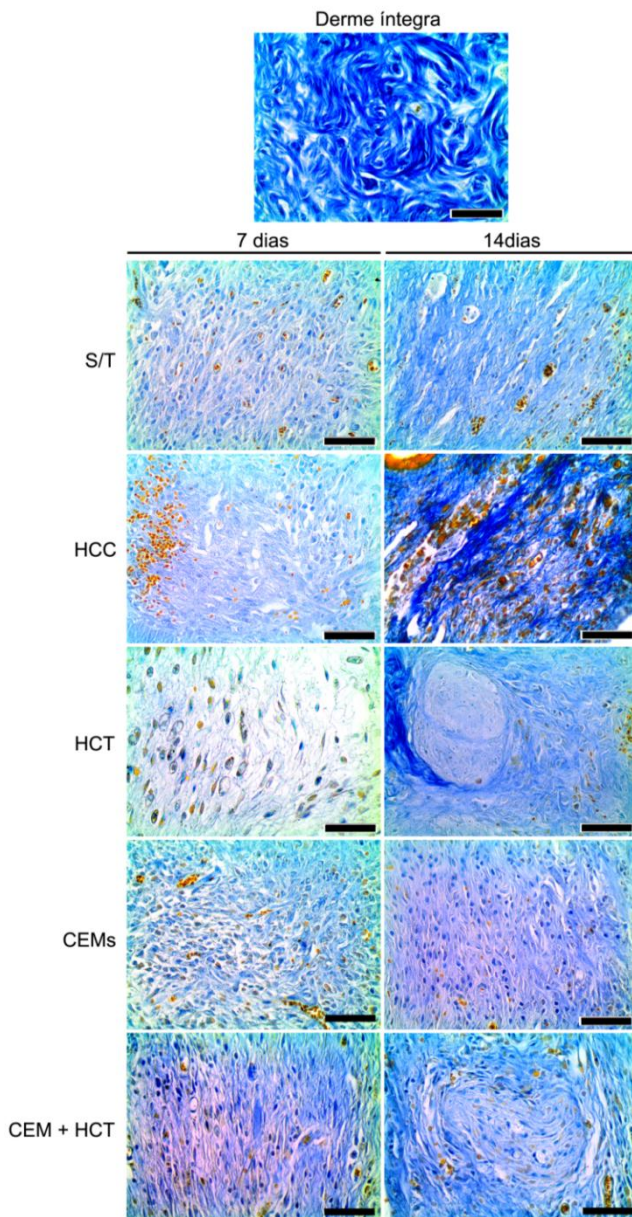
Representação gráfica da densidade de vasos. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$  para S/T, HCT e CEM+HCT;  $n = 5$  para CEM e  $n = 3$  para

HCC). Análise de 5 campos/animal. \*  $p < 0,05$  por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas.

Em conjunto, esses resultados mostram que as CEM + HCT não são capazes de estimular a vascularização. Por outro lado, o grupo que recebeu o HCC apresentou uma diminuição na densidade dos vasos.

Por fim, foi avaliado o depósito de colágeno no tecido de granulação, pois durante a fase proliferativa os fibroblastos migram para a lesão e depositam diversos componentes da matriz extracelular, principalmente o colágeno. A avaliação do depósito de colágeno foi realizada em lâminas coradas com Mallory, onde a intensidade da cor é referente à quantidade de colágeno. As lâminas do 7º dia em todos os grupos apresentaram baixa produção de colágeno (Figura 20) quando comparada à derme íntegra. Em contrapartida, no 14º dia o depósito de colágeno apresentou um aumento, podendo ser observada a organização das fibras, principalmente no grupo S/T.

**Figura 21 – Depósito de colágeno (cor azul) na derme íntegra e nos grupos experimentais no 7º e 14º dia de pós-operatório.**

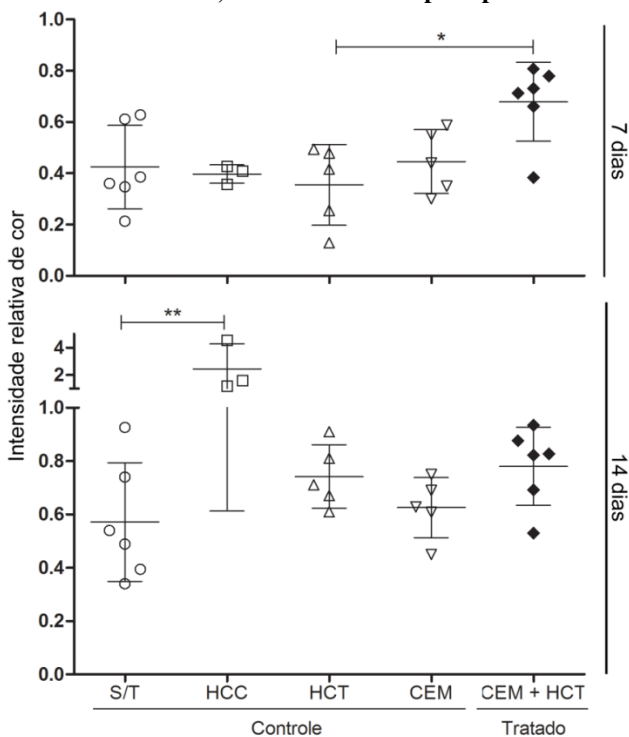




Imagens representativas de cortes histológicos corados com Mallory. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas. Escala: 50  $\mu$ m.

A quantificação do colágeno foi determinada pela intensidade relativa da cor azul referente ao colágeno nas lâminas histológicas coradas com Mallory, onde o valor 1 significa que a intensidade é igual ao tecido íntegro (Figura 21). Os resultados obtidos mostram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na intensidade de cor no 7º dia de pós-operatório no grupo tratado CEM + HCT ( $0,67 \pm 0,15$ ) em relação ao grupo HCT ( $0,35 \pm 0,15$ ). Não foi observada diferença em relação aos grupos HCC ( $0,39 \pm 0,03$ ), S/T ( $0,42 \pm 0,16$ ) e CEM ( $0,44 \pm 0,12$ ).

**Figura 22 - Intensidade relativa da cor azul referente ao depósito de colágeno nas lesões cutâneas, nos dias 7 e 14 de pós-operatório.**



Representação gráfica da intensidade da cor azul/pixel em relação ao tecido íntegro de lâminas histológicas coradas com Mallory. Os valores representam as

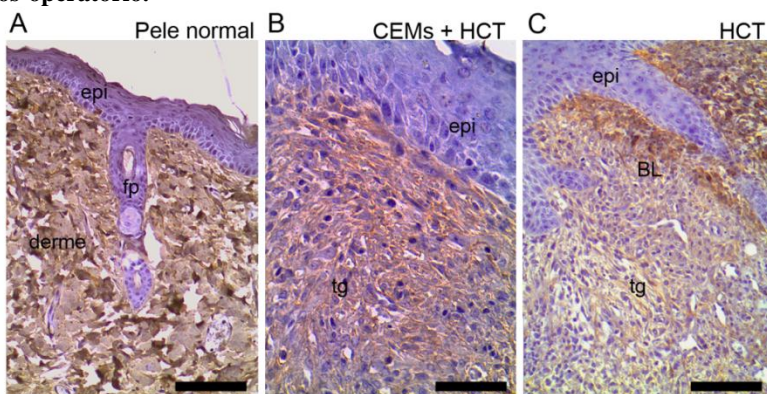


médias  $\pm$  desvio padrão (n= 6 para S/T e CEM+HCT; n= 5 para HCT e CEM; n= 3 para HCC. Análise de 5 campos/animal. \*  $p<0,05$  e \*\*  $p<0,01$  por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas.

No 14º dia de pós-operatório, o grupo controle HCC ( $2,44 \pm 1,83$ ) apresentou um aumento acentuado (cerca de 3 vezes) na intensidade da cor em relação aos demais grupos, sendo superior inclusive à intensidade do tecido íntegro. Além disso, o grupo tratado com CEM + HCT ( $0,78 \pm 0,14$ ) continuou apresentando uma intensidade de cor maior em relação aos grupos S/T ( $0,57 \pm 0,22$ ), CEM ( $0,64 \pm 0,04$ ), HCT ( $0,74 \pm 0,11$ ).

Por fim, foi verificado o tipo de colágeno presente no tecido de granulação, uma vez que no estágio de remodelamento a matriz de colágeno do tipo III é substituída por colágeno do tipo I. Para isso, foi realizada a imunomarcação de colágeno do tipo I nas lâminas histológicas (Figura 22). Foi possível observar na lâmina controle que a derme normal apresentou marcação forte e específica das fibras desse tipo de colágeno (Figura 22A). Em contrapartida, quando analisadas as lâminas dos grupos experimentais, foi observada uma marcação fraca e específica do colágeno tipo I, onde foi possível delimitar a borda da lesão pela intensidade da marcação (Figura 22B e C).

**Figura 23 – Depósito de colágeno do tipo I nas lesões cutâneas no 14º dia de pós-operatório.**



Imagens representativas do depósito de colágeno do tipo I (cor marrom) na derme íntegra e no tecido de granulação, obtidas através de imuno-histoquímica. Em roxo, coloração com hematoxilina. (A) Pele normal. Escala: 100  $\mu$ m. (B)

Tecido de granulação do grupo CEM + HCT. Escala: 50  $\mu\text{m}$ . (C) Borda da lesão do grupo HCT evidenciando a diferença no depósito de colágeno na pele lesionada. Escala: 100  $\mu\text{m}$ . epi= epiderme; fp= folículo piloso; tg= tecido de granulação; BL= borda da lesão.

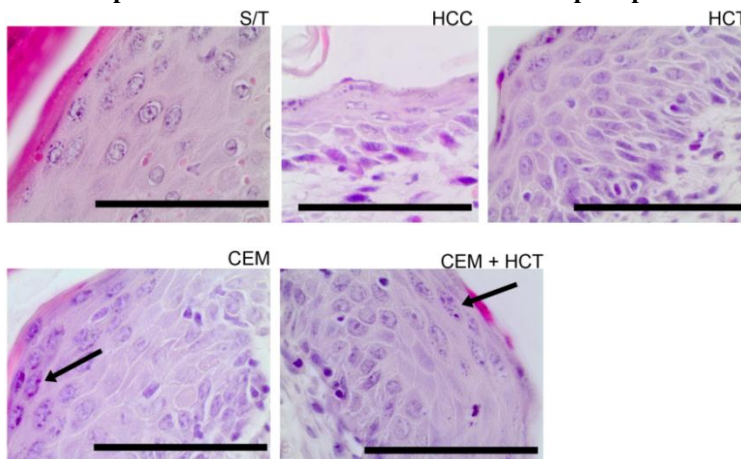
Em conjunto, esses resultados mostram que a presença das CEM encapsuladas no HCT acarretou um aumento benéfico no depósito de colágeno em comparação ao grupo S/T em ambos os períodos analisados. Da mesma forma, o grupo que recebeu o HCC apresentou um intenso depósito de colágeno no 14º dia, entretanto por ultrapassar a intensidade do tecido normal esse resultado é prejudicial.

Sumarizando, os resultados obtidos na análise do tecido de granulação mostram um aumento na espessura do tecido formado e no depósito de colágeno no grupo tratado com CEM encapsuladas em HCT em todos os períodos analisados. Em contrapartida o grupo controle HCC apresentou no 14º uma redução na espessura do tecido e na densidade de vasos além de um aumento no depósito de colágeno.

#### 4.4.4. Reepitelização

A reepitelização é um parâmetro importante que define o sucesso do processo de reparo, pois essa estrutura fornece uma barreira física para infecções. O processo de reepitelização foi avaliado pela análise de lâminas histológicas coradas com HE, no 14º dia de pós-operatório (Figura 25). Nessa etapa, foi possível observar a formação de grânulos no citoplasma dos queratinócitos diferenciados.

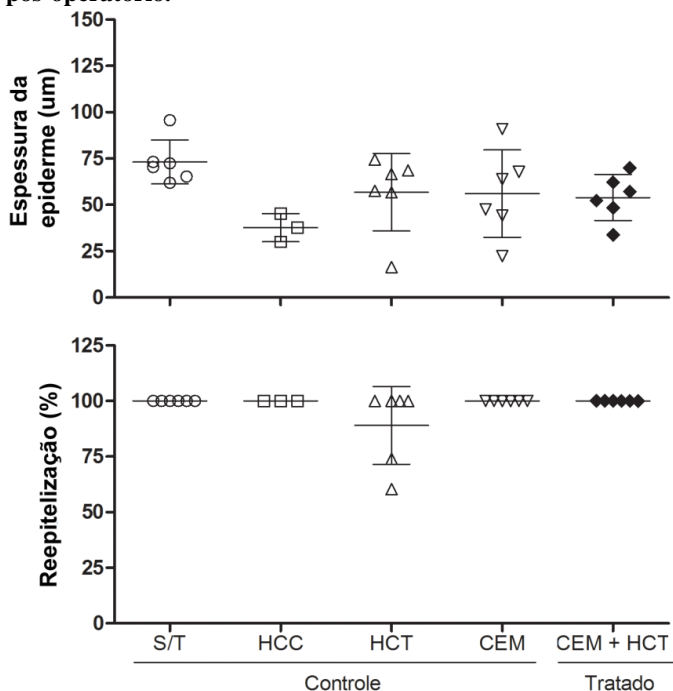
**Figura 24 – Epiderme do tecido cicatricial no 14º dia de pós-operatório.**



Imagens representativas de cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina. Reepitelização do tecido cicatricial após 14 dias de pós-operatório. As setas pretas indicam os queratinócitos diferenciados identificados pela presença de grânulos. S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas. Escala: 50  $\mu$ m.

Nesse âmbito, os resultados obtidos mostram que não há diferença na espessura da epiderme, sendo que o grupo S/T apresentou a maior espessura da epiderme ( $73,15 \pm 11,85 \mu\text{m}$ ), seguido pelos grupos HCT ( $56,78 \pm 20,85 \mu\text{m}$ ), CEM ( $56,12 \pm 23,51 \mu\text{m}$ ), CEM + HCT ( $53,97 \pm 12,44 \mu\text{m}$ ) e HCC ( $37,69 \pm 7,66 \mu\text{m}$ ). Além disso, foi observado que todos os grupos, exceto o HCT ( $86,87 \pm 14,49\%$ ), apresentaram reepitelização completa (Figura 26).

**Figura 25 - Espessura da epiderme e porcentagem de reepitelização no 14º dia de pós-operatório.**



Representação gráfica da espessura da epiderme e da porcentagem de reepitelização. (n= 6 para S/T, HCT, CEM e CEM+HCT e n= 3 para HCC) S/T= sem tratamento; HCC= hidrogel de carragenana comercial; HCT= hidrogel de carragenana teste; CEM= células estromais multipotentes humanas.

## 4.5. RESUMO DOS RESULTADOS

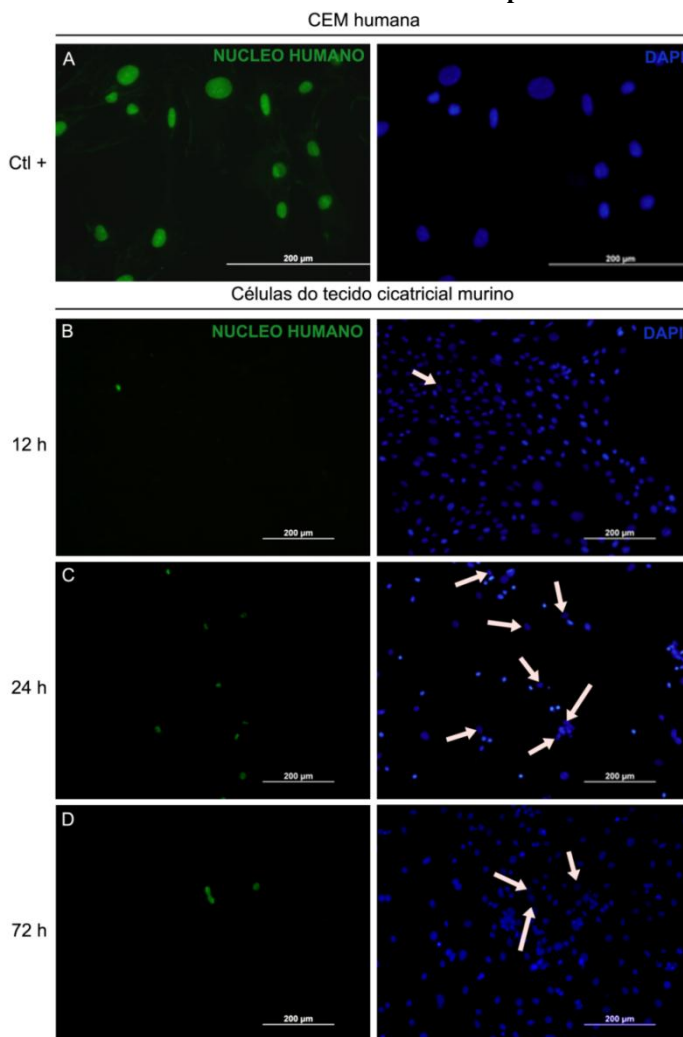
Parâmetro analisado	Células estromais mesenquimais encapsuladas em Hidrogel de carragenana teste			Células estromais mesenquimais em solução			Hidrogel de carragenana teste			Hidrogel de carragenana comercial		
	3 dias	7 dias	14 dias	3 dias	7 dias	14 dias	3 dias	7 dias	14 dias	3 dias	7 dias	14 dias
Tamanho da lesão	↓	↑	=	↓	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑	=
Infiltrado de leucócitos	↑	x	x	↑*	x	x	↑*	x	x	↑	x	x
Tecido de granulação	x	↑	↑	x	↑	↑*	x	↑	↑	x	↑	↓
Depósito de colágeno	x	↑	↑	x	↑	↑	x	↓	↑	x	↓	↑**
Densidade de vasos	x	↓	↓	x	↓*	↑	x	↓*	↓	x	↓	↓*
Espessura da epiderme	x	x	↓	x	x	↓	x	x	↓	x	x	↓
Reepitelização	x	x	=	x	x	=	x	x	↓	x	x	=

↑ = aumento; ↓ = redução; = resultado semelhante; \* p<0,05; \*\* p<0,01; x = análise não realizada neste período

#### 4.6. DETECÇÃO DAS CEM HUMANAS NO TECIDO CICATRICIAL

A obtenção dos fragmentos do tecido cicatricial murino após o tratamento com CEM encapsuladas em HCT foi realizada após 12, 24 e 72 h de pós-operatório. Após 6 dias em cultura as células recuperadas dos fragmentos foram imunomarcadas com anticorpo antinúcleo humano. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 27, onde pode ser observada a marcação nuclear específica nas CEM humanas na condição controle (Figura 27A) e a presença de células humanas no tecido cicatricial murino nos 3 períodos analisados (Figura 27B, C e D). Sendo assim, pode-se afirmar que as CEM humanas entregues na lesão pelo hidrogel de carragenana teste são capazes de permanecer na lesão por até 3 dias.

**Figura 26 – Células humanas marcadas com anticorpo antinúcleo humano.**



(A) Cultura de CEM humanas como controle positivo. Células humanas multipotentes (em verde) recuperadas do tecido cicatricial murino após 12 h (B), 24 h (C) e 72 h (D) de pós-operatório. As setas brancas indicam a localização do núcleo das células humanas entre as células murinas. Escala: 200  $\mu$ m. Na cor verde, marcação do núcleo humano. Na cor azul, marcação do núcleo com DAPI.

## 5. DISCUSSÃO

A busca por novos tratamentos para lesões cutâneas tornou-se uma necessidade, não só para diminuir os custos atuais, mas também para obter melhores resultados clínicos. Portanto, neste trabalho foi avaliado o uso de hidrogéis de carragenana (HC) como um novo arcabouço para entrega de células estromais multipotentes (CEM) humanas no tratamento de lesões cutâneas induzidas cirurgicamente em camundongos.

Os resultados obtidos na caracterização química da carragenana teste motivam o seu uso em experimentos pré-clínicos, pois a classe *kappa* não induz inflamação exagerada como descrito para a classe *lambda* (CHEN et al., 2014). A carragenana da classe *kappa* é amplamente utilizada pela indústria alimentícia e farmacêutica (RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE et al., 2002; CAMPO et al., 2009), apesar disso, são poucos os trabalhos que avaliaram a utilização dos hidrogéis de *kappa*-carragenana na medicina regenerativa (SANTO et al., 2009; LIM et al., 2010; MIHAILA et al., 2012; POPA et al., 2013). A maioria dos estudos biológicos que utilizam hidrogéis de carragenana está relacionada ao uso da classe *lambda* em modelos de indução inflamatória e, além disso, não apresentam informações relacionadas à concentração, classe ou alga, tornando difícil estabelecer um consenso em relação aos resultados, ressaltando a importância de maiores estudos (SANTO et al., 2009; BHATTACHARYYA et al., 2010; BHATTACHARYYA; TOBACMAN, 2012).

As carragenanas avaliadas também apresentam semelhança na concentração de sulfato, o que permite o uso da carragenana comercial como controle nos experimentos *in vivo*, uma vez que a sulfatação das carragenanas apresenta grande influência na coagulação sanguínea, uma importante etapa do processo de reparo tecidual (OPOKU; QIU; DOCTOR, 2006). Apesar de a concentração de sulfato estar acima do esperado para a classe *kappa*, estudos mostram que essa porcentagem pode variar de acordo com a espécie e metodologia de extração. Em estudo realizado em 2001, Hayashi demonstrou que a concentração de sulfato da carragenana derivada da alga *K. alvarezii* cultivada em Ubatuba/SP pode variar de 23,08 a 32,86%, dependendo da linhagem, e de 28,61 a 48,52% em relação à metodologia de extração (HAYASHI, 2001).

Baseado nos resultados obtidos na caracterização química, o estudo pré-clínico da associação das CEM com o HC foi realizado somente com a carragenana teste devido aos seguintes motivos: (1) em



trabalho anterior do grupo foi observado que as CEM encapsuladas nos hidrogéis de carragenana teste (HCT) e comercial (HCC) apresentam a mesma capacidade de proliferação e atividade metabólica *in vitro* (ANGULSKI, 2012); (2) a semelhança na composição química entre as amostras; (3) minimizar a utilização de animais justamente pela alta similaridade química e funcional das carragenanas; (4) o custo reduzido da carragenana teste, o que a torna mais atrativa vislumbrando-se uma futura utilização clínica.

Para permitir um processo de reparo semelhante ao dos humanos, foi realizada a sutura de um anel de silicone exatamente do mesmo tamanho da lesão original. O objetivo deste procedimento foi diminuir a contração da pele, característica que é responsável por grande parte do reparo em murinos. Ao contrário da pele murina, o reparo humano (onde a pele é aderida aos tecidos subcutâneos) ocorre majoritariamente pela formação de um novo tecido. Entretanto, muitos animais conseguiram retirar o anel e o curativo tópico Tegaderm<sup>®</sup>, aumentando as variações dos resultados. Ainda assim, a associação das CEM humanas ao HCT apresentou uma melhora modesta no reparo de lesões cutâneas nos diferentes parâmetros analisados.

A associação das CEM ao HCT apresentou resultados positivos no início do processo de reparo auxiliando no fechamento da lesão quando comparado com o grupo controle HCT. Entretanto, não foram observadas diferenças quando comparado ao grupo S/T.

O grupo HCT apresentou um atraso no fechamento da lesão, sobretudo no início do processo de reparo (3 dias). Esse atraso foi provavelmente responsável pelo não fechamento completo da lesão ao fim do período experimental (14 dias). O retardo na recuperação pode estar relacionado a um processo inflamatório acentuado, uma vez que em lesões com maior inflamação a redução da lesão ocorre mais lentamente devido ao atraso da fase proliferativa.

A avaliação da densidade de leucócitos confirmou o aumento da inflamação no grupo controle HCT no 3º dia de pós-operatório, entretanto esse aumento não foi observado no grupo HCC (Figura 17). Essa diferença pode ser explicada pela presença de impurezas na carragenana teste devido ao processo de extração manual. A literatura descreve que além da galactose e sulfato, as mostras de carragenana podem conter resíduos de xilose, glucose, ácido irônico, bem como alterações nos substituintes como éteres metílicos e grupos piruvato (VAN DE VELDE et al., 2002). Esses contaminantes podem ser liberados rapidamente, uma vez que o hidrogel de carragenana em contato com o ambiente iônico encontrado na lesão perde a estabilidade

estrutural. Entretanto, para a adequada discussão desses resultados, é necessária a realização de um ensaio para determinação da pureza das amostras, o que parece ser possível realizar apenas por Cromatografia Gasosa, o qual não estava disponível para a realização deste estudo.

Além disso, a ausência de células gigantes multinucleadas no local de inoculação indica que os macrófagos foram capazes de fagocitar os hidrogéis num contexto de inflamação moderada. Esses resultados corroboram com os encontrados por Popa e colaboradores (2013), onde foi observado um processo inflamatório moderado após o implante subcutâneo de  $\kappa$ -carragenana em ratos (POPA et al., 2013). Além disso, o grupo realizou análises dos nódulos linfáticos e demonstraram que o tratamento com  $\kappa$ -carragenana não inicia uma reação sistêmica.

Diferentemente do grupo HCT, onde foi observado um aumento na densidade de leucócitos em relação ao grupo S/T, os resultados obtidos no grupo CEM + HCT mostraram que não houve alteração na densidade do infiltrado leucocitário. Interessantemente, a densidade dos leucócitos no grupo CEM também estava aumentada, apesar disso não houve atraso no fechamento da lesão como observado no grupo HCT.

Essa diferença na infiltração dos leucócitos encontrada no grupo CEM e CEM + HCT pode ser explicada pela polarização das CEM (WEIDENBUSCH; ANDERS, 2012; MANTOVANI et al., 2013). A capacidade de polarização das CEM consiste em alterar o seu fenótipo para o tipo CEM-1 (pró-inflamatório) ou CEM-2 (anti-inflamatório) e assim modular a inflamação em resposta aos estímulos do ambiente. A alteração no fenótipo pode gerar efeitos tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo (KEATING, 2012; LE BLANC; MOUGIAKAKOS, 2012; PROCKOP; OH, 2012). A atividade das CEM sobre o sistema imune ocorre influenciando majoritariamente a ativação dos macrófagos para fenótipos do tipo M1 ou M2 (WEIDENBUSCH; ANDERS, 2012). Enquanto o macrófago M1 libera citocinas pró-inflamatórias, o macrófago M2 secreta citocinas anti-inflamatórias.

Os resultados obtidos no grupo HCT mostram um ambiente mais inflamatório, o que pode estar induzindo a polarização das CEM para um fenótipo anti-inflamatório. A polarização das células estromais multipotentes em ambientes mais inflamatórios, ocasiona a liberação de fatores que induzem a diferenciação dos monócitos e neutrófilos para um fenótipo anti-inflamatório (LE BLANC; MOUGIAKAKOS, 2012; BERNARDO; FIBBE, 2013). Isto poderia explicar a não alteração da densidade de leucócitos no grupo tratado com CEM + HCT quando comparado ao grupo S/T.

Por outro lado, o ambiente mais inflamatório observado no grupo tratado com as CEM também pode ser benéfico. Estudos *in vitro* sugerem que essa atividade estimulante do sistema imune só ocorre quando essas células são expostas a níveis baixos de citocinas inflamatórias, dando continuidade ao processo de reparo (REN et al., 2008; LI et al., 2012). Essa hipótese pode explicar porque apesar do maior infiltrado inflamatório não houve atraso no fechamento da lesão no grupo CEM. Entretanto, para confirmar o efeito das CEM polarizadas é necessária a identificação dos macrófagos M1 e M2 no tecido cicatricial, o que parece ser possível somente por meio de um painel de marcadores ou pela avaliação da expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e arginase por RT-qPCR.

É importante ressaltar que se tivessem sido utilizadas células murinas ao invés de humanas, provavelmente teríamos obtido resultados diferentes na fase inflamatória. Alguns estudos mostram que diversas moléculas envolvidas na atividade imuno-modulatória das células estromais multipotentes são divergentes entre humanos e camundongos. Por exemplo, as células humanas quando estimuladas com IFN- $\gamma$  apresentam uma ação imunossupressora pela inibição da proliferação de linfócitos T, enquanto as células murinas sob a mesma influência secretam quimiocinas que atraem os linfócitos (REN et al., 2008).

A capacidade imunossupressora das CEM humanas é uma propriedade de extrema importância quando se trata de transplantes. Essa propriedade contribui para uma rejeição mais tardia das CEM em comparação ao que ocorre em outros tipos de células, embora com o tempo as CEM também sejam rejeitadas (ANKRUM; ONG; KARP, 2014). Essa capacidade imunossupressora ocorre por meio da inibição da proliferação de linfócitos T e da diferenciação de células dendríticas, além da proliferação e produção de anticorpos pelos linfócitos B (SINGER; CAPLAN, 2011).

Esse efeito imunossupressor das CEM ocorre principalmente devido aos baixos níveis de HLA (antígeno leucocitário humano) de classe I e a ausência de HLA de classe II. Além disso, também é importante a interação célula-célula e a produção de diversas moléculas como: HGF, TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-2, TNF- $\alpha$ , prostaglandina E2, indoleamina 2,3 digoxigenase (IDO) e moléculas de HLA-G (RIZZO, 2013).

Nesse contexto, por ser um transplante xenogênico é de suma importância verificar a presença das células humanas na lesão. Para isso, diversas metodologias foram padronizadas, mas não apresentaram resultados satisfatórios, como a imuno-histoquímica (Apêndice A), a

hibridização *in situ* (Apêndice B) e a transfecção das células humanas com GFP (Apêndice C). A detecção das células humanas foi possível somente por meio da recuperação das células do tecido cicatricial e imunomarcacão após 6 dias de cultura. Por meio dessa metodologia, foi detectada a presença de células humanas no tecido cicatricial até 3 dias de pós-operatório. Entretanto, apesar de confirmar a presença das células humanas no tecido cicatricial, a metodologia utilizada não permite identificar a localização, a quantidade e a capacidade de integração ao tecido. Sendo assim, novos métodos são necessários para identificar a localização das células estromais multipotentes durante o processo de reparo cutâneo, bem como detectá-las por um período maior.

Ainda assim, a detecção das células humanas na lesão, juntamente com o quadro de inflamação semelhante ao grupo S/T, sugerem um baixo efeito imunogênico dessas células. Esses resultados corroboram com a literatura e indicam que as CEM humanas derivadas da pele também podem ser imunoprivilegiadas possibilitando sua atuação no processo de reparo mesmo em transplantes xenogênicos (MANSILLA et al., 2005, RYAN et al., 2005; RIZZO, 2013).

Além disso, os dados obtidos corroboram com estudos que mostram que a maioria das CEM morrem dentro de 48 h após inoculação sistêmica em modelos de transplante de CEM humanas em camundongos imunodeficientes (KIDD et al., 2009), CEM de camundongo em animais singênicos (LEE et al., 2009) e CEM de rato em animais alogênicos (TOMA et al., 2009). Ainda assim, apesar do curto tempo de permanência, esses estudos também mostram resultados benéficos no tratamento com CEM.

Nesse sentido, devido à baixa sobrevivência no local da lesão, é possível que os resultados observados tenham ocorrido pela ação parácrina e não pela diferenciação das CEM e integração no tecido murino. Por isso, a avaliação das proteínas secretadas pelas CEM humanas derivadas da derme é de grande importância para os estudos pré-clínicos, podendo abrir novas perspectivas para o uso em outras patologias. Sendo assim, o nosso grupo iniciou neste ano a avaliação dos fatores secretados pelas CEM por meio de análises de proteômica para posterior tratamento de lesões cutâneas e avaliação da real importância da presença das CEM na lesão.

A atividade parácrina das células estromais multipotentes vem sendo estudada principalmente por análises do meio condicionado (sobrenadante do cultivo de células) e os resultados indicam a presença de diversos mediadores do processo de reparo, incluindo fatores de

crescimento, citocinas e quimiocinas (GNECCHI M, ZHANG Z, 2008; CHEN et al., 2008). Outros trabalhos também têm mostrado que as células estromais multipotentes diminuem a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , enquanto aumentam a produção das citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; DI ROCCO et al., 2010; MAHARLOOEI et al., 2011; WONG et al., 2011).

A ação parácrina das CEM é capaz de influenciar também a fase proliferativa do processo de reparo pela secreção de FGF e de HGF, estímulo da migração de fibroblastos e dos níveis de colágeno I e III, embora os mecanismos moleculares ainda não estejam elucidados (KIM et al., 2007; LI et al., 2009; SUGA et al., 2009).

Na fase proliferativa, foi observado um aumento no depósito de colágeno nos grupos CEM e CEM+HCT, o que acarretou no aumento da espessura do tecido de granulação, tornando-se mais evidente no 14º dia. Entretanto, não é possível estabelecer se o aumento da espessura do tecido de granulação e do colágeno foram benéficos ou não, pois as fibras de colágeno mostraram-se mais organizadas e maduras no grupo S/T. Esses resultados sugerem que o estímulo da fibroplasia ocorreu em tempos diferentes, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre os tipos de colágeno predominantes em ambos os grupos para determinar o real benefício desse resultado.

Apesar de o colágeno ser o principal componente do tecido de granulação, o depósito acentuado observado no grupo controle HCC é prejudicial e pode ter sido o responsável pela diminuição da densidade de vasos. A literatura mostra que matrizes densas são capazes de sequestrar fatores de crescimento pró-angiogênicos, como o FGF-2, e dificultar a sua ação, impedindo a formação de novos vasos (SAKSELA, 1990).

Os fatores secretados pelas CEM também são capazes de influenciar a neovascularização. Essa é uma etapa crítica durante o processo de reparo, sendo necessária para sustentar o tecido de granulação e para sobrevivência das células epidermais. As evidências do potencial pró-angiogênico das CEM vêm crescendo. Estudos descrevem que as CEM são capazes de produzir diversos fatores como Ang-1, VEGF, HGF, EGF, PDGF, KGF e TGF- $\beta$  que atuam diretamente nas células endoteliais (CHEN et al., 2008). Ao contrário do esperado, os resultados obtidos mostram que as CEM administradas seja em solução ou encapsuladas no HCT não apresentaram diferença na vascularização.

De maneira geral, apesar das lacunas existentes para compreender os mecanismos moleculares, as evidências do potencial de regeneração da associação das CEM ao HCT ficaram evidentes principalmente no início do processo de reparo. Entretanto não foi possível avaliar a eficiência na entrega das células utilizando o HCT como arcabouço, porém acredita-se que o curto tempo de permanência seja suficiente para a célula exercer seu efeito parácrino. Como conclusão, a administração de CEM humanas utilizando como veículo o HCT representa uma abordagem terapêutica nova, barata e potencialmente aplicável para o tratamento de feridas crônicas, onde as células estromais multipotentes possam atenuar o processo inflamatório, ou em outros modelos animais onde o processo de cicatrização seja mais semelhante ao humano.

## 6. CONCLUSÕES

- A carragenana teste obtida da alga *Kappaphycus alvarezzi* cultivada em Florianópolis, tem potencial para ser utilizada como arcabouço na medicina regenerativa, pois apresenta características químicas semelhantes à carragenana comercial do tipo *kappa* (Sigma®), além de ter um custo reduzido;
- O tratamento de lesões cutâneas com o hidrogel de carragenana teste apresentou melhores resultados quando comparado ao hidrogel de carragenana comercial;
- O tratamento de lesões cutâneas com células estromais multipotentes encapsuladas em hidrogel de carragenana teste apresentou um menor infiltrado leucocitário, não alterou a espessura do tecido de granulação, a vascularização e aumentou o depósito de colágeno quando comparado aos grupos tratados com hidrogel de carragenana teste e com células em solução apresenta;
- O tratamento de lesões cutâneas com células estromais multipotentes encapsuladas em hidrogel de carragenana teste não alterou a densidade do infiltrado leucocitário, a vascularização e a espessura da epiderme, aumentou o tecido de granulação e o depósito de colágeno quando comparado ao grupo sem tratamento;
- As CEM humanas quando entregues na lesão utilizando o HCT foram detectadas no tecido cicatricial murino 3 dias após o pós-operatório; entretanto não foi possível avaliar a eficiência na entrega das células.

## REFERÊNCIAS

AFANASYEV, B. V et al. A . J . Friedenstien , founder of the mesenchymal stem cell concept. **Cellular Therapy and Transplantation**, v. 1, n. 3, p. 35–38, 2009.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–22, 15 fev. 2005.

ANGULSKI, A. B. B. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA EM HIDROGEL DE CARRAGENANA EXTRAÍDO DA ALGA VERMELHA KAPPAPHYCUS ALVAREZII. **Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e do Desenvolvimento)**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis., 2012.

ANKRUM, J. A; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 252–60, mar. 2014.

ANNABI, N. et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 4, p. 371–83, ago. 2010.

ATYIEH, B. S.; COSTAGLIOLA, M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 33, n. 4, p. 405–13, jun. 2007.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização : uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, 2005.

BERNARDO, M. E.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. **Cell stem cell**, v. 13, n. 4, p. 392–402, 3 out. 2013.

BHATTACHARYYA, S. et al. Carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n. 10, p. 906–13, out. 2010.



BHATTACHARYYA, S.; TOBACMAN, J. K. Molecular signature of kappa-carrageenan mimics chondroitin-4-sulfate and dermatan sulfate and enables interaction with arylsulfatase B. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1058–1063, 2012.

BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: Recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 2059–2081, 2013.

BONFIELD, T. L. et al. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 51, jan. 2010.

BOTTCHER-HABERZETH, S.; BIEDERMANN, T.; REICHMANN, E. Tissue engineering of skin. **Burns**, v. 36, n. 4, p. 450–460, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. BRASÍLIA. **PORTARIA Nº- 3.242, DE 30 DE DEZEMBRO DE 2011**, 2011.

BURKE, J. F. et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Annals of surgery**, v. 194, n. 4, p. 413–28, out. 1981.

CAMPO, V. L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167–180, jun. 2009.

CHEN, H. et al. Degraded  $\lambda$ -carrageenan activates NF- $\kappa$ B and AP-1 pathways in macrophages and enhances LPS-induced TNF- $\alpha$  secretion through AP-1. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 7, p. 2162–2170, 2014.

CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e1886, jan. 2008.

CHEN, M.; PRZYBOROWSKI, M.; BERTHIAUME, F. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 37, p. 1–16, 2009.

CRIGLER, L. et al. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 21, n. 9, p. 2050–2063, 2007.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 9, p. 2287–99, set. 2008.

DI NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838–43, 15 maio 2002.

DI ROCCO, G. et al. Enhanced healing of diabetic wounds by topical administration of adipose tissue-derived stromal cells overexpressing stromal-derived factor-1: biodistribution and engraftment analysis by bioluminescent imaging. **Stem cells international**, v. 2011, p. 304562, jan. 2010.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **The Biochemical journal**, v. 78, p. 312–9, fev. 1961.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, nov. 2003.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **The Journal of investigative dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514–25, mar. 2007.

ESTRADA, R. et al. Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. **Journal of cellular physiology**, v. 219, n. 3, p. 563–71, jun. 2009.

FALANGA, V. et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in

murine and human cutaneous wounds. **Tissue engineering**, v. 13, n. 6, p. 1299–312, jun. 2007.

FREYMAN, T. et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. **European heart journal**, v. 27, n. 9, p. 1114–22, maio 2006.

FU, X. et al. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 14, n. 3, p. 325–35, jan. 2006.

GNECCHI M, ZHANG Z, N. A. ET AL. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation research**, v. 103, n. 11, p. 1204–1219, 2008.

GREAVES, N. S. et al. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. **Journal of dermatological science**, v. 72, n. 3, p. 206–17, dez. 2013.

GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5557, p. 1009–14, 8 fev. 2002.

GRIFFITH, L. G.; SWARTZ, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. March, p. 211–224, 2006.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. May, 2008.

HAN, S. S. Topical formulations of water-soluble chitin as a wound healing assistant. **Fibers and Polymers**, v. 6, n. 3, p. 219–223, set. 2005.

HAYASHI, L. Extração, teor e propriedades de carragenana de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva, em cultivo experimental em Ubatuba, SP. **Dissertação de mestrado - USP**, 2001.

HAYASHI, L. Contribuição à Maricultura da Alga Vermelha *Kappaphycus alvarezii* ( Rhodophyta , Solieriaceae ) para Produção de Carragenana. **Tese de Doutorado (USP)**, 2007.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S.; BOX, C. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 14, p. 2213–2219, 2010.

HOLOSKI. **Head and Neck Cancer Guide**.

HUBBELL, J. A. Biomaterials in Tissue Engineering. **Nature biotechnology**, 1995.

HUNG, S.-C. et al. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 9, p. 2363–70, set. 2007.

JEREMIAS, T. D. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89542, jan. 2014.

JUNMIN ZHU, R. E. M. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Rev Med Devices**, v. 8, n. 5, p. 607–626, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup> edição ed. [s.l.] Guanabara koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Edição, 12 ed. [s.l.] Guanabara koogan, 2013.

KAMEL, R. A. et al. Tissue engineering of skin. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 3, p. 533–555, 2013.

KARA, S. et al. Cation effects on sol-gel and gel-sol phase transitions of kappa-carrageenan-water system. **International journal of biological macromolecules**, v. 31, n. 4-5, p. 177–85, 15 jan. 2003.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. **Cell stem cell**, v. 10, n. 6, p. 709–16, 14 jun. 2012.

KIDD, S. et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 10, p. 2614–23, out. 2009.

KIM, B. S.; BAEZ, C. E.; ATALA, A. Biomaterials for Tissue Engineering. **Annals of biomedical engineering**, p. 2–9, 3 jul. 2000.

KIM, W.-S. et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Journal of dermatological science**, v. 48, n. 1, p. 15–24, out. 2007.

KINNAIRD, T. et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. **Circulation**, v. 109, n. 12, p. 1543–9, 30 mar. 2004.

KRAMPERA, M. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3722–9, 1 maio 2003.

LAZAROUS, D. F. et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. **Circulation**, v. 94, n. 5, p. 1074–82, 1 set. 1996.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, n. 5, p. 383–96, maio 2012.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. **Surgery**, v. 101, n. 7, 2001.

LEE, R. H. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. **Cell stem cell**, v. 5, n. 1, p. 54–63, 2 jul. 2009.

LEVENSON, S. M.; JANUARY, S. The Healing of Rat Skin Wounds. **Annals of Surgery**, 1965.

LI, H.; FU, X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. **Cell and tissue research**, v. 348, n. 3, p. 371–7, jun. 2012.

LI, L. et al. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. **Molecular biology reports**, v. 36, n. 4, p. 725–31, abr. 2009.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 605–31, jan. 2005.

LI, W. et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 1505–1513, 2012.

LIM, Y. et al. Preparation and Biocompatibility Study of Gelatin / Kappa-carrageenan Scaffolds. **Blood**, v. 18, n. 1, p. 29–34, 2010.

LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 47–55, jan. 2005.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 874–80, 22 fev. 2007.

MACRI, L.; CLARK, R. A F. Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. **Skin pharmacology and physiology**, v. 22, n. 2, p. 83–93, jan. 2009.

MAES, N. B. et al. Uso de matriz de regeneração dérmica em pacientes vítimas de queimaduras em hospital infantil de referência de Santa Catarina: nove anos de experiência. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 1, p. 6–14, 2012.

MAHARLOOEI, M. K. et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. **Diabetes research and clinical practice**, v. 93, n. 2, p. 228–34, ago. 2011.

MANO, J. F. et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 4, p. 999–1030, 2007.

MANSILLA, E. et al. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. **Transplantation proceedings**, v. 37, n. 1, p. 292–4, jan. 2005.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–85, jan. 2013.

MAXSON, S. et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–9, fev. 2012.

MEHRBAN, N.; SMITH, A. M.; GROVER, L. M. EVALUATION OF IOTA-CARRAGEENAN AS A POTENTIAL TISSUE ENGINEERING SCAFFOLD Nazia Mehrban, Alan M. Smith, Liam M. Grover School of Chemical engineering, University of Birmingham, UK. p. 1–6, 1999.

MEIRELLES, L. D. S. et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 20, n. 5-6, p. 419–27, 2009.

MICHEL, A S.; MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. **Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations.** **International journal of biological macromolecules**, ago. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9283036>>

MIHAILA, S. M. et al. Photocrosslinkable Kappa-Carrageenan Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Advanced healthcare materials**, p. 1–13, 27 dez. 2012.

MIHAILA, S. M. et al. Fabrication of endothelial cell-laden carrageenan microfibers for microvascularized bone tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 8, p. 2849–60, 11 ago. 2014.

MOGOȘANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 127–136, 2014.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 225, p. 115–21, jan. 2003.

NELSON, C. M.; BISSELL, M. J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 287–309, jan. 2006.

NIEMANN, C.; WATT, F. M. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. **Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 4, p. 185–192, 2002.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 2, p. 126–131, 2011.

OPALENIK, S. R.; DAVIDSON, J. M. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 19, n. 2, p. 1–19, 2005.

OPOKU, G.; QIU, X.; DOCTOR, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of kappa carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 2, p. 134–138, jul. 2006.

PEREIRA, L. et al. Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 223–8, jul. 2003.

PLACE, E. S.; EVANS, N. D.; STEVENS, M. M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature materials**, v. 8, n. 6, p. 457–70, jun. 2009.

POPA, E. G. et al. Evaluation of the in vitro and in vivo biocompatibility of carrageenan-based hydrogels. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 2009, p. 1–11, 17 jan. 2013.



PROCKOP, D. J.; OH, J. Y. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 20, n. 1, p. 14–20, jan. 2012.

REN, G. et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. February, p. 141–150, 2008.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 331–43, nov. 1975.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. **Nature**, v. 265, n. 5593, p. 421–424, 3 fev. 1977.

RIZZO, R. Immunosuppressive Properties of HLA-G Molecules Produced by Mesenchymal Stromal Cells. **Transplantation Technologies & Research**, v. 3, n. 2, p. 2–3, 2013.

ROCHA, P. M. et al. Encapsulation of adipose-derived stem cells and transforming growth factor- 1 in carrageenan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 26, n. 5, p. 493–507, 12 set. 2011.

RUITER, G. A. DE; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. December, p. 389–395, 1997.

RYAN, J. M. et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 2, n. 1, p. 8, 26 jul. 2005.

SAKSELA, O. Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. **The Journal of Cell Biology**, v. 110, n. 3, p. 767–775, 1 mar. 1990.

SANTA CATARINA. DIÁRIO OFICIAL. **Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, número 19.247**, 2012.

SANTO, V. E. et al. Carrageenan-based hydrogels for the controlled delivery of PDGF-BB in bone tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 6, p. 1392–401, 8 jun. 2009.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, p. 2581–2587, 2008.

SILVA, F. R. F. et al. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26–33, jan. 2010.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 457–78, jan. 2011.

SUGA, H. et al. IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 1, p. 238–49, jan. 2009.

TOMA, C. et al. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. **Circulation research**, v. 104, n. 3, p. 398–402, 13 fev. 2009.

TRONO, G. C. Eucheuma and Kappaphycus : Taxonomy and Cultivation. **Bulletin of Marine Science**, n. 12, p. 51–65, 1992.

VAN DE VELDE, F. et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 3, p. 73–92, mar. 2002.

VARGHESE, J. S.; CHELLAPPA, N.; FATHIMA, N. N. Gelatin-carrageenan hydrogels: Role of pore size distribution on drug delivery process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 346–351, 2014.

VERRECCHIA, F.; MAUVIEL, A. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. **Journal of Investigative Dermatology**, p. 211–215, 2002.

WANG, X. et al. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. **Nature protocols**, v. 8, n. 2, p. 302–9, fev. 2013.

WEIDENBUSCH, M.; ANDERS, H.-J. Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 5-6, p. 463–77, jan. 2012.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835–70, jul. 2003.

WONG, V. W. et al. Pullulan hydrogels improve mesenchymal stem cell delivery into high-oxidative-stress wounds. **Macromolecular bioscience**, v. 11, n. 11, p. 1458–66, 10 nov. 2011.

WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **International journal of biomaterials**, v. 2012, p. 926059, jan. 2012.

WU, Y.; ZHAO, R. C. H.; TREDGET, E. E. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 5, p. 905–15, maio 2010.

WU, Z. et al. Use of decellularized scaffolds combined with hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor for skin tissue engineering. **Tissue engineering. Part A**, v. 21, n. 1-2, p. 390–402, 14 jan. 2015.

YANG, H. S. et al. Enhanced skin wound healing by a sustained release of growth factors contained in platelet-rich plasma. **Experimental & molecular medicine**, v. 43, n. 11, p. 622–9, 30 nov. 2011.

YUAN, H. et al. Immunomodulation and antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharides. **Cancer letters**, v. 243, n. 2, p. 228–34, 18 nov. 2006.

**ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA  
E GENÉTICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** “Avaliação da associação de células tronco mesenquimais humanas à hidrogéis de carragenana para regeneração dérmica”

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Giordano Vosgrau Calloni, RG - 2.663.872

**Pesquisador participante:** Michele Patrícia Rode

**Telefone para contato:** (48) 37214582

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Avaliação da associação de células tronco mesenquimais humanas à hidrogéis de carragenana para regeneração dérmica”, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Giordano Vosgrau Calloni. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37216905.

Declaramos que as normas da Resolução 196/96 e suas complementares serão obedecidas em todas as fases da pesquisa.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Este estudo tem por objetivo realizar a cultura, em laboratório de células tronco derivadas de sua pele. Este estudo é necessário porque as mais variadas pesquisas podem ser realizadas com essas células de pele e estas pesquisas diminuem o número de trabalhos realizados em

humanos.

Serão utilizados os pedaços de couro cabeludo/pele que sobram das cirurgias plásticas. Isto não traz riscos, pois esses pequenos pedaços de couro cabeludo/pele que sobram normalmente são jogados fora (lixo hospitalar). A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células tronco da pele sobre um material natural (carragenana) retirado de algas cultivadas no estado de Santa Catarina. Este estudo pretende avaliar o potencial de reparo da pele de camundongos a qual será inoculada as células tronco da pele encapsuladas no hidrogel de carragenana. Estudos como estes são necessários, pois nos proporcionarão conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias utilizando células-tronco da pele, como por exemplo, na reconstituição de nova pele em casos de queimaduras. Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

### CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa  
“Avaliação da associação de células tronco mesenquimais humanas à hidrogéis de carragenana para regeneração dérmica.

**Assinatura do paciente ou responsável:**

\_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

**ANEXO B – Parecer consubstanciado do CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da associação de células-tronco mesenquimais humanas à hidrogéis de carragenana para regeneração dérmica

**Pesquisador:** Giordano Wosgrau Calloni

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 14231213.6.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E INOVAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 301.488

**Data da Relatoria:** 10/06/2013

**Situação do Parecer:** Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:** Não

**Considerações Finais a critério do CEP:** colegiado

FLORIANÓPOLIS, 11 de Junho de 2013

---

**Assinado por:**

**Washington Portela de Souza**  
(Coordenador)

## ANEXO C – Parecer CEUA

### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00810

**Título**Protocolos experimentais utilizados pelo LACERT/UFSC que envolvem animais da espécie *Mus musculus***Data de Entrada**

21/06/2012

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

29/11/2012

**Considerações**

Ofício nº 113/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Andréa Gonçalves Trentin - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética  
- CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dois mil seiscentos e cinquenta e seis camundongos (*Mus musculus*).

Procedência Biotério Setorial LACERT (BEG/CCB)

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 28/02/2017

Data 29/11/2012

**Parecer(es):**

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE

## APÊNDICE A – Imunomarcção de núcleo humano

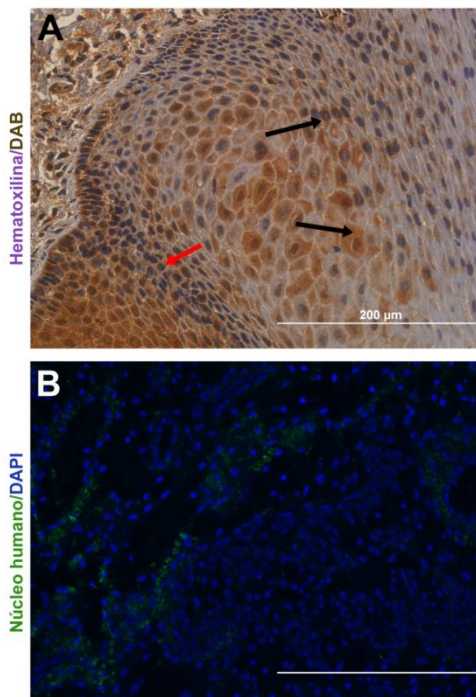
A padronização da técnica de imuno-localização utilizando um anticorpo que reconhece proteínas nucleares humanas foi realizada em cortes histológicos de mucosa bucal humana, cedidos pelo Dr. Filipe Modolo Siqueira do Laboratório de Patologia Bucal/UFSC.

Para a realização do ensaio de imuno-histoquímica as lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em série decrescente de álcool (100, 90 e 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada por calor, através da incubação em tampão citrato, pH 6,0 a 93-96°C, por 40 min. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de PBS acrescido de 5 % de leite em pó desnatado, durante 30 min. As amostras foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal (Mouse, IgG1) antinúcleo humano (MAB1281, Millipore) durante 14 horas, em câmara úmida, à 4°C. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (6 %) em metanol. As amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG1 de camundongo) conjugado à biotina durante 1 h à TA e após foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase. Após a incubação, as amostras foram marcadas com diaminobenzidina-3,3' (DAB) durante 5 min e contra coradas com hematoxilina por 2 min. As amostras foram então desidratadas em série crescente de álcool (70, 80 e 100° GL), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan.

A figura 28A mostra o resultado obtido onde é possível observar a marcação (cor marrom) de alguns núcleos, a marcação não específica no citoplasma e vários núcleos não marcados. Em seguida, foram realizadas alterações na temperatura (TA e 37°C) e tempo de incubação (1 h) do anticorpo primário em ensaio de imuno-histoquímica resultando na não marcação. Após, foi realizada a imuno-fluorescência com amplificação do sinal utilizando tiramida (1:1500) e marcação dos núcleos com DAPI. Os resultados obtidos (Figura 28B) também apresentaram marcação não específica.



**Figura 27 – Imunomarcção de lâmina de mucosa bucal humana utilizando o anticorpo antinúcleo humano.**



(A) Imagem de imuno-histoquímica. Em marrom, imunomarcção com anticorpo antinúcleo humano. Em roxo, coloração com hematoxilina. As setas pretas indicam a marcação inespecífica do citoplasma e a seta vermelha indica o núcleo não marcado. (B) Imagem de imuno-fluorescência. Em verde, marcação do núcleo humano. Em azul, marcação do núcleo com DAPI. Escala: 200 µm.

## APÊNDICE – B – Hibridização *in situ*

A hibridização *in situ* permite identificar sequências específicas de nucleotídeos, podendo ser DNA ou RNA. Neste trabalho foi utilizando a sonda *ALU* que foi gentilmente doada pelo Dr. José Marques de Brito Neto da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Para esta técnica foi utilizado como controle positivo lâminas de placenta humana cedidas pelo Dr. Rogério Gargioni da UFSC e lâminas do tecido cicatricial murino após o tratamento com CEM humanas.

As lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas numa série de etanol (100°, 95° e 70° GL). Em seguida os cortes histológicos foram permeabilizados com proteinase K (2 µg/ml) em PBS por 14 min, pós-fixados com formaldeído 4% em PBS por 20 min e incubados em tampão de hibridização por 10 min à TA. A hibridização foi realizada durante 14 h à 70°C em tampão de hibridização, acrescido de 10 ng/ml da sonda *ALU* marcada com digoxigenina. Em seguida foram realizadas lavagens com o tampão de hibridização à 65°C seguida de lavagem com o tampão de ácido maleico pH 7,5 (MAB) à TA. Após as lavagens os cortes histológicos foram incubados com solução de bloqueio (20 % de SBF e 2% do reagente de bloqueio Boehringer-Roche) em tampão MAB acrescido de *Tween* (MABT). A imunomarcação foi realizada utilizando um anticorpo antidigoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche) por 14h. Novas lavagens foram realizadas em tampão MAB e a revelação foi realizada utilizando nitroazul de tetrazólio (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) (Sigma), conforme recomendações do fabricante.

Foi observado que houve marcação na lâmina de placenta humana embora tenha sido fraca. Entretanto, o tecido cicatricial murino não permaneceu íntegro após os processos de incubação. Esse resultado leva a crer que o protocolo de fixação e/ou o embocamento das amostras em parafina possam ter impossibilitado o processo de hibridização.

### Tampão de hibridização:

- formamida (50%)
- SSC 20X pH7,5 (1,3x)
- EDTA (5mM)
- tRNA (50mg/ml)
- Tween 20 (0,2 %)
- CHAPS (0,5 %)
- heparina (100 µg/ml)

- água (qsp 500 ml)

SSC 20X pH7,5:

- citrato de sódio (0,3 M)

- NaCl (3 M)

Tampão de ácido maleico pH 7,5:

- ácido maleico (0,1 M)

- NaCl (0,15 M)

- solução de NaOH 1N (qsp pH 7,5)

## APÊNDICE C – Transfecção com GFP

Para rastrear as células humanas *in vivo* foi realizada a técnica de transfecção utilizando o plasmídeo pCX-EGFP, que foi gentilmente doado pelo Dr. Masaru Okabe, da Universidade de Osaka, Japão. Esse plasmídeo confere às células a expressão de GFP, o que possibilita a observação das células transfectadas pela exposição à luz UV.

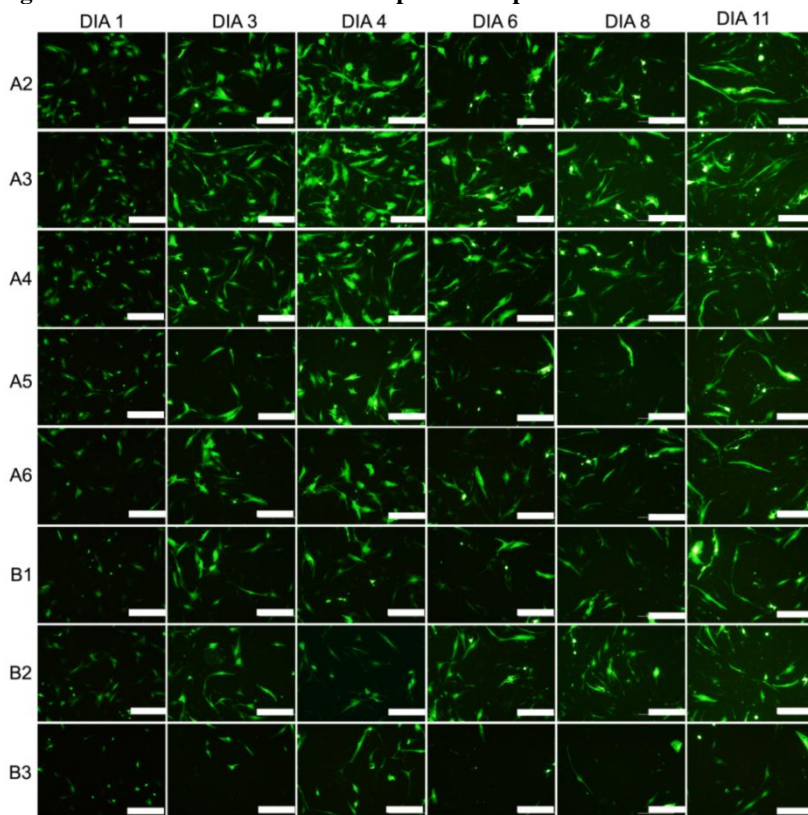
A amplificação do plasmídeo pCX-EGFP foi realizada na linhagem de bactérias *Escherichia coli* - DH5 alfa (Invitrogen®) conforme as orientações do fabricante e a seleção das bactérias que incorporaram o plasmídeo foi realizada através do tratamento com ampicilina. As extrações dos plasmídeos GFP foram realizadas através do *kit Midi Prep* (Qiagen®). As concentrações de DNA extraídos foram determinadas por espectrofotometria em espectrofotômetro *Nanovue* (GE). O plasmídeo GFP clonado foi diluído em tampão eluente e armazenado em tubos a -20°C para posterior utilização. Todas as metodologias de transformação das bactérias foram realizadas no LACERT - UFSC em colaboração com o Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura (LIAA) - UFSC, que possui a autorização para manipulação de organismos geneticamente modificados.

Inicialmente a metodologia foi realizada utilizando  $5 \times 10^4$  células, uma quantidade 10 vezes menor do que a utilizada para a inoculação nos animais. Essa redução foi imprescindível para possibilitar a avaliação das condições, caso contrário seria necessário um grande número de células/replicata. Quando as CEM atingiram 80 % de confluência em garrafas de cultura, foram tripsinizadas, lavadas com PBS e suspendidas em tampão de ressuspensão (Invitrogen). Em seguida foi acrescentado o DNA plasmidial (1 µg de DNA/poço) à solução de células ( $5 \times 10^4$  células/poço). Após, 100 µL desta solução foram aspirados, submetidos ao pulso elétrico (Tabela 2) no eletroporador *Neon® Transfection System* (Invitrogen) e adicionados a 1 poço da placa de 24 poços pré-incubada com 500 µl/poço de meio DMEM suplementado com 10 % de SBF e sem antibióticos. A cultura foi mantida em estufa a 37°C, contendo 5 % de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95 % de umidade.

**Tabela 2 - Condições testadas na eletroporação para transfecção das CEM humanas com o plasmídeo pCX-EGFP.**

Amostra	Poço	Voltagem do pulso	Largura do pulso (milissegundo – ms)	Número de pulsos
1	A1	Controle sem pulso	-	-
2	A2	1.400	20	1
3	A3	1.500	20	1
4	A4	1.600	20	1
5	A5	1.700	20	1
6	A6	1.100	30	1
7	B1	1.200	30	1
8	B2	1.300	30	1
9	B3	1.400	30	1

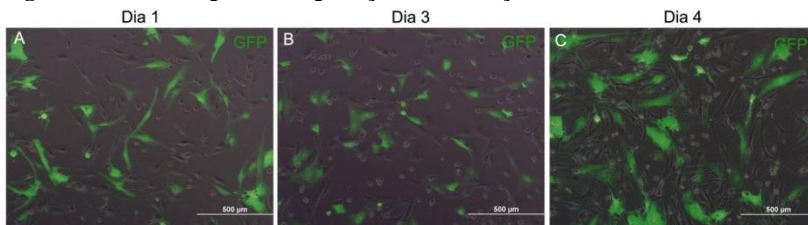
Para avaliar a eficiência da transfecção as células foram visualizadas no microscópio Olympus IX71 e fotografadas em câmera Olympus DP71 (Figura 29). As imagens foram capturadas nos dias 1, 3, 4, 6, 8 e 11, e analisadas segundo os seguintes critérios: eficiência da transfecção, menor taxa de mortalidade e maior período de dias expressando o plasmídeo.

**Figura 28 – CEM transfetadas com plasmídeo pCX-GFP.**

Imagens representativas das CEM de derme humana transfetadas em todas as condições testadas (A2 – A6; B1 – B3) após 1, 3, 4, 6, 8 e 11 dias. Escala: 500  $\mu\text{m}$ .

Na condição A3 (um pulso de 1.500 V por 20 ms), cerca de 45% das células apresentaram a expressão de GFP 24 h após a transfecção (Figura 30A). Entretanto, foi constatado que cerca de 50% das células submetidas à técnica morreram nesse mesmo período. Além disso, as células continuaram expressando GFP durante 11 dias, com maior expressão no 4º dia (Figura 30C).

**Figura 29 – CEM após eletroporação na condição A3.**



Imagens das CEM transfetadas com 1 pulso de 1.500 V durante 20 ms. Imagem do contraste de fase mostrando os fragmentos celulares e as células viáveis aderidas, sobreposta com a imagem de imunofluorescência das células transfetadas. (A) CEM 1 dia após a transfecção. (B) CEM 3 dias após a transfecção. (C) CEM 4 dias após a transfecção. Escala: 500 µm

Após o estabelecimento da melhor condição de transfecção das CEM humanas com plasmídeos, a metodologia foi repetida utilizando 1000 µl da solução contendo  $5 \times 10^5$  células e 10 µg de DNA em placa de 35 mm contendo 1 ml de DMEM suplementado com 10% de SBF e sem antibióticos. Entretanto foi observado que 24 h após a transfecção 100% das células submetidas à técnica estavam mortas. Esse resultado pode ter sido ocasionado por algum problema nos reagentes. Novos experimentos seriam necessários para padronizar a técnica utilizando  $5 \times 10^5$  células, o que inviabiliza o experimento devido à quantidade de material biológico necessário e o custo do material utilizado na eletroporação.